

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
im Universitätsklinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
(Geschäftsführ. Dir.: Prof. Dr. W. Oelkers)

ENTWICKLUNG EINES ASSAYS FÜR SCHILDDRÜSENSTIMULIERENDE
ANTIKÖRPER UND KORRELATION DER AKTIVITÄTEN SCHILDDRÜSEN-
STIMULIERENDER UND TSH-BINDUNG-INHIBIERENDER ANTIKÖRPER

UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE DES MORBUS BASEDOW

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
JOHANNES HENSEN
aus Papenburg/Ems

1982

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Referent: Prof. Dr. H. Schleusener

Korreferent: Prof. Dr. U. Hopf

Tag der Promotion: 1.2.1984

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen der Statistik	2
3.	Methoden der Statistik	3
4.	Statistische Inferenz	4
5.	Statistische Tests	5
6.	Statistische Schätzungen	6
7.	Statistische Regressionen	7
8.	Statistische Zeitreihen	8
9.	Statistische Simulationen	9
10.	Statistische Software	10
11.	Statistische Tabellen	11
12.	Statistische Diagramme	12
13.	Statistische Formeln	13
14.	Statistische Beispiele	14
15.	Statistische Aufgaben	15
16.	Statistische Lösungen	16
17.	Statistische Zusammenfassungen	17
18.	Statistische Referenzen	18
19.	Statistische Anmerkungen	19
20.	Statistische Ergänzungen	20
21.	Statistische Glossare	21
22.	Statistische Indexe	22
23.	Statistische Bibliographien	23
24.	Statistische Literatur	24
25.	Statistische Quellen	25
26.	Statistische Hilfsmittel	26
27.	Statistische Werkzeuge	27
28.	Statistische Materialien	28
29.	Statistische Dokumente	29
30.	Statistische Aufzeichnungen	30
31.	Statistische Protokolle	31
32.	Statistische Berichte	32
33.	Statistische Zusammenfassungen	33
34.	Statistische Schlussfolgerungen	34
35.	Statistische Empfehlungen	35
36.	Statistische Vorschläge	36
37.	Statistische Überlegungen	37
38.	Statistische Überlegungen	38
39.	Statistische Überlegungen	39
40.	Statistische Überlegungen	40
41.	Statistische Überlegungen	41
42.	Statistische Überlegungen	42
43.	Statistische Überlegungen	43
44.	Statistische Überlegungen	44
45.	Statistische Überlegungen	45
46.	Statistische Überlegungen	46
47.	Statistische Überlegungen	47
48.	Statistische Überlegungen	48
49.	Statistische Überlegungen	49
50.	Statistische Überlegungen	50
51.	Statistische Überlegungen	51
52.	Statistische Überlegungen	52
53.	Statistische Überlegungen	53
54.	Statistische Überlegungen	54
55.	Statistische Überlegungen	55
56.	Statistische Überlegungen	56
57.	Statistische Überlegungen	57
58.	Statistische Überlegungen	58
59.	Statistische Überlegungen	59
60.	Statistische Überlegungen	60
61.	Statistische Überlegungen	61
62.	Statistische Überlegungen	62
63.	Statistische Überlegungen	63
64.	Statistische Überlegungen	64
65.	Statistische Überlegungen	65
66.	Statistische Überlegungen	66
67.	Statistische Überlegungen	67
68.	Statistische Überlegungen	68
69.	Statistische Überlegungen	69
70.	Statistische Überlegungen	70
71.	Statistische Überlegungen	71
72.	Statistische Überlegungen	72
73.	Statistische Überlegungen	73
74.	Statistische Überlegungen	74
75.	Statistische Überlegungen	75
76.	Statistische Überlegungen	76
77.	Statistische Überlegungen	77
78.	Statistische Überlegungen	78
79.	Statistische Überlegungen	79
80.	Statistische Überlegungen	80
81.	Statistische Überlegungen	81
82.	Statistische Überlegungen	82
83.	Statistische Überlegungen	83
84.	Statistische Überlegungen	84
85.	Statistische Überlegungen	85
86.	Statistische Überlegungen	86
87.	Statistische Überlegungen	87
88.	Statistische Überlegungen	88
89.	Statistische Überlegungen	89
90.	Statistische Überlegungen	90
91.	Statistische Überlegungen	91
92.	Statistische Überlegungen	92
93.	Statistische Überlegungen	93
94.	Statistische Überlegungen	94
95.	Statistische Überlegungen	95
96.	Statistische Überlegungen	96
97.	Statistische Überlegungen	97
98.	Statistische Überlegungen	98
99.	Statistische Überlegungen	99
100.	Statistische Überlegungen	100

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

I.	Einleitung	9
II.	Patienten, Methodik, Materialien	13
II.1.	Bestimmung von TBIAb im Radioliganden-rezeptorassay	13
II.2.	Präparation einer Schilddrüsenmembran-suspension	14
II.2.1.	Homogenisierung der Schilddrüse	14
II.2.2.	Fraktionierte Zentrifugation	15
II.3.	Inkubationsansatz zur Adenylzyklase-stimulation (Stimulationsassay)	16
II.4.	cAMP-Radioimmunoassay	17
II.5.	Statistik	18
II.6.	Bestimmung der Membrankonzentration	19
II.7.	Präparation von Immunglobulin G	19
II.8.	Dialyse von Humanseren	19
II.9.	Patienten	20
II.10.	Materialien	20
III.	Ergebnisse	21
III.A.	Entwicklung und Optimierung eines Assays für schilddrüsenstimulierende Antikörper	21
III.A.1.	Herstellung einer Schilddrüsenmembransus-pension mit TSH-stimulierbarer Adenylzyklase-aktivität und Optimierung der Inkubations-bedingungen	21

III.A.2.	Einfluß von TSH auf die Adenylzyklase und Vergleich der stimulatorischen Potenz verschiedener Thyreotropinpräparationen	30
III.A.3.	Beeinflussung von konkurrierenden enzymatischen Reaktionen um das Substrat (ATP) und das Produkt (cAMP) der Adenylzyklase	36
III.A.4.	Einfluß von Guanylnukleotiden auf die Regulation der Adenylzyklase	41
III.A.5.	Nachweis von Thyreoidea stimulierenden Antikörpern (TSAb) im entwickelten TSH-sensiblen Adenylzyklase-Stimulationsassay	52
III.B.	Vergleich von TSAbs- und TBIAbs-Aktivität im Serum von Patienten mit Hyperthyreose und bilateral diffus speichernder Schilddrüse	64
IV.	Diskussion	73
IV.A.	Entwicklung eines Assays für TSAbs	74
IV.B.	Korrelation von TBIAbs- und TSAbs-Aktivität im Serum	84
V.	Zusammenfassung	90
VI.	Literaturverzeichnis	91

Abkürzungen

ADP	- Adenosindiphosphat
AC	- Adenylzyklase, Adenylatzyklase
ARS	- ATP-regenerierendes-System (CP + CK)
ATP	- Adenosintriphosphat
cAMP	- zyklisches Adenosinmonophosphat
CK	- Kreatinkinase/
CP	- Kreatinphosphat
DMSO	- Dimethylsulfoxid
EDTA	- Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGTA	- Ethyleneglycoltetraacetic Acid
GppNHp	- 5'-Guanylylimidodiphosphat
GTP	- Guanosintriphosphat
LATS	- Long-Acting Thyroid Stimulator
RIA	- Radioimmunoassay
RRA	- Radioligandenrezeptorassay
TBIAb, TBIA	- Thyrotropin Binding Inhibiting Antibodies
TDA	- Thyrotropin Displacing Antibodies
Tris	- Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TSAb	- Thyroid Stimulating Antibodies
TSH	- Thyreoidea Stimulierendes Hormon
TSI	- Thyroid Stimulating Immunoglobulins

Zur Terminologie:

Zur Vereinfachung wird in dieser Arbeit der Terminus TSI (Thyroid stimulating immunoglobulins = schilddrüsenstimulierende Immunglobuline) für die Summe aller pathologischen Antikörper gegen die Schilddrüsenzellmembran (TSH-Rezeptor) benutzt. Eine andere Bezeichnung (LATS, TSAb, TBIAb) charakterisiert damit gleichzeitig die Bestimmungsmethode.

I. EINLEITUNG

Seit den Untersuchungen von Adams und Purves (1) im Jahre 1956 besitzt die Pathophysiologie eine neue Vorstellung über die Entstehung der Hyperthyreose vom Typ Basedow: Thyreoidea stimulierende Immunglobuline (TSI) als Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor und/oder seine enge Umgebung imitieren die Effekte des Thyreotropins an der Schilddrüsenzelle und führen so zur erhöhten Schilddrüsenhormonproduktion.

Besonderes Interesse erhielt das TSI, da es versprach, ein guter Parameter für die Aktivität des Morbus Basedow auch unter thyreostatischer Therapie zu sein.

In der Folgezeit wurden eine Vielzahl von Nachweismethoden für TSI entwickelt, die sich alle der Fähigkeiten dieser Immunglobuline bedienen, wie das Thyreotropin des Hypophysenvorderlappens zu wirken:

McKenzie (2) entwickelte den von Adams und Purves (1) erstmals beschriebenen in vivo Stimulationsassay für TSI weiter. Er injizierte Patientenserum in ^{125}J vorbehandelte Mäuse und konnte vom Anstieg der Schilddrüsenhormonkonzentration (gemessen als ^{125}J -Aktivität im Serum) auf die Höhe des TSI-Titers schließen. Den Namen Long-Acting Thyroid Stimulator (LATS) erhielt der Faktor aufgrund seiner gegenüber Thyreotropin insgesamt prolongierten Wirkung.

Im Radioligandenrezeptorassay, einem kompetitiven Bindungsassay (3), wird von der Vorstellung ausgegangen, daß der TSH-Rezeptor das Antigen für die schilddrüsenstimulierenden Immunglobuline darstellt. Es wird die Fähigkeit der Immunglobuline gemessen, die Bindung von radioaktiv markiertem Thyreotropin an den TSH-Rezeptor

zu inhibieren (Thyrotropin-Binding Inhibiting-Antibodies = TBIAb).

Auch der LATS-Protector Assay (4) fällt in die Gruppe der Bindungsinhibitionsassays: Ein LATS positives Standardserum wird mit menschlichem Schilddrüsenhomogenat und Patientenserum inkubiert. Anschließend wird im McKenzie Bioassay die LATS-Aktivität des Standardserums bestimmt. Man bezeichnet das Patientenserum als LATS-Protector positiv, wenn das inkubierte Standardserum weiterhin LATS positiv bleibt. Ein LATS-P positives Serum verhindert also die Neutralisation von LATS durch menschliches Schilddrüsenhomogenat.

Weitere Methoden machten sich die Tatsachen zunutze, daß die Adenylzyklase (AC) der Schilddrüsenzellmembran (5) oder auch die T_3 -Produktion der Schilddrüsenzelle (6,7) durch TSI angeregt werden können (Thyroid-Stimulating Antibodies = TSAb).

Diesen Stimulationsassays für TSAb, zu denen auch der McKenzie-Bioassay für LATS gehört, stehen die Bindungs-Inhibitionsassays für LATS-P und TBIAb gegenüber. Die Bindungs-Inhibitionsassays berücksichtigen nur den ersten Schritt der Hormonwirkung, die Bindung an den Rezeptor, während in den Stimulationsassays eine biologische Aktivität der Immunglobuline gemessen wird.

Sugenoya et al. (8) und Macchia et al. (9) verglichen Stimulationsassay und Bindungsinhibitionsassay für TSI miteinander und fanden zwischen TSAb- und TBIAb-Aktivität keine Korrelation. Endo et al. (10) berichteten über einen Patienten mit primärem Myxödem, einer hohen TBIAb-Aktivität ohne TSAb-Aktivität und schlossen daraus auf das Vorhandensein blockierender

Antikörper. Bliddal et al. (11,12) errechneten eine Korrelation zwischen TBIAb und TSAb mit einem Korrelationsfaktor $r = 0,58$ und berichteten über einen Morbus Basedow Patienten, der im Verlauf seiner Erkrankung TBIAb negativ blieb, bei dem jedoch sowohl Adenylzyklase stimulierende Aktivität als auch - in einem späteren Stadium der Erkrankung - Adenylzyklase inhibierende Aktivität nachweisbar war. Sie diskutierten, daß bei der Mehrzahl der Patienten beide Aktivitäten vorhanden sind und daß ein heterogenes Immunglobulin produziert wird, wobei je nach Krankheitsverlauf mehr blockierende (inhibierende) oder mehr stimulierende Aktivität vorhanden ist. Unterstützt wurde diese Theorie durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Komponenten des TSH-Rezeptors durch Yavin et al. (13).

Einige dieser Antikörper aktivieren die Adenylzyklase, ohne die TSH-Bindung zu inhibieren, während andere nur den TSH-Rezeptor blockieren.

Diese Untersuchungen veranlaßten uns, neben dem schon in unserem Labor etablierten Radioligandenrezeptorassay für TBIAb einen Stimulationsassay für TSAb durchzuführen bzw. zu entwickeln. Der Vergleich von TSAb und TBIAb im Serum von Patienten mit "toxic diffuse goiter" sowie TSAb- und TBIAb-Aktivitäten im Verlauf der Erkrankung sollten 3 Fragen beantworten:

1. Gibt es eine Korrelation zwischen TBIAb und TSAb?
2. Wie kann man sich die bisher publizierten unterschiedlichen Resultate erklären?
3. Kann im Verlauf der Erkrankung eine Dissoziation von TBIAb- und TSAb-Aktivität auftreten?

Voraussetzung für einen Vergleich zwischen Thyreotropin-Bindung-inhibierender und Adenylzyklase-stimulierender Aktivität war die Herstellung einer Adenylzyklase-Aktivität enthaltenden menschlichen "cruden" Schilddrüsenzellmembran-Suspension und die Entwicklung eines einfachen und sensiblen Stimulationsassays. Ausgegangen wurde von dem 1971 publizierten Adenylzyklaseassay an Schweineschilddrüsenzellmembranen von Wolff und Jones (14). Wesentliches Augenmerk wurde auf die Optimierung des Assays gelegt, insbesondere wurden die Einflüsse des Guanylnukleotids GTP und seines Analogons GppNHp auf die Stimulation der Adenylzyklase durch Thyreotropin untersucht. GTP ist an einigen Adenylzyklasesystemen (15,16) ein essentieller Cofaktor für eine Stimulation durch Hormon.

In Teil A der Ergebnisse sowie der Diskussion wird auf die Entwicklung und Optimierung des Stimulationsassays eingegangen, in Teil B auf die Korrelation von TSAb und TBIAb.

II. PATIENTEN, METHODIK, MATERIALIEN

II.1. Bestimmung von TBIAb im Radioligandenrezeptorassay

Bei der Bestimmung von TBIAb wird die Inhibierung der Bindung von radioaktiv markiertem TSH durch TBIAb ausgenutzt. In unserem Labor wird die TBIAb-Bestimmung nach einem modifizierten Verfahren von Mehdi und Nussey (17) sowie von Smith und Hall (18) ausgeführt:

Schilddrüsenmembransuspension wird mit Immunglobulin von Patienten für 20 min bei 37 C vorinkubiert. Anschließend wird mit ^{125}J radioaktiv markiertes TSH hinzugegeben und für 45 min bei 37 C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Membran wird die an die Membran als ^{125}J -TSH gebundene Aktivität in einem Gamma-Counter gemessen. Die an der Membran gebundene Aktivität ist um so geringer, je höher die TBIAb-Aktivität des Immunglobulins ist.

Die Aktivität jedes Ansatzes wird mit der ursprünglich hinzugefügten Aktivität (ca. 10.000 Ipm) in Relation gebracht und als % Bindung bezeichnet. Die Bindungswerte jedes Ansatzes werden um den Betrag der unspezifischen Bindung (Ansatz mit einem Überschuß von TSH statt Immunglobulin) vermindert und als spezifische Bindung bezeichnet. Der Mittelwert der spezifischen Bindung von 6 Normalseren (Normal-Bindung) minus 2 SD wird als untere Normalgrenze definiert.

Alle IgG-Präparationen mit darunterliegenden Werten werden als positiv betrachtet.

Zur graphischen Darstellung und zur Korrelationsberechnung ist ein TBIAb-Index definiert, der allerdings in seiner numerischen Aussagekraft sehr fragwürdig ist (19):

$$\text{TBIAb-Index: } 1 - \frac{\text{Pat.-Bindung}}{\text{Normal-Bindung}}$$

Auf den TBIAb-Index wird in der Diskussion ausführlich eingegangen.

Eine genaue Beschreibung der in unserem Labor durchgeführten Methode findet sich in (3).

II.2. Präparation einer Schilddrüsenmembransuspension

II.2.1. Homogenisierung der Schilddrüse

Aus frischen operierten Schilddrüsen von Patienten mit euthyreoter Struma, Knotenstruma oder Morbus Basedow wurde durch fraktionierte Zentrifugation eine Zellmembran mit TSH-stimulierbarer Adenylzyklaseaktivität gewonnen.

Frisches Schilddrüsen Gewebe wurde am Operationstag nach Transport in einem eisgekühlten Behälter im Kühlraum bei 4 C verarbeitet. Etwa 30 g des Schilddrüsen Gewebes wurden von Fett- und Bindegewebe sowie von offensichtlich regressiv entzündlichen Veränderungen und Verkalkungen befreit. Anschließend wurde das Gewebe mit Skalpell und Schere in kleine, etwa 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten und mit der 10-fachen Menge eines Tris-Magnesium-Sucrose-Puffers versetzt (10 mM Tris-HCl, 0,25 M Sucrose, 1 mM MgCl₂, pH 7,4 bei 25 C). Mit einem Silverson-mixer-emulsifier wurde das Gewebe dann 3 x 5 sek mit maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine einlagige Gazeschicht gegeben, um Bindegewebsstränge zu entfernen. Die Gaze wurde mit einer geringen Menge Puffer gespült und leicht ausgedrückt. Die weitere Homogenisierung erfolgte mit 3 Zügen und 400 UPM für etwa 5 sek in einem leichtgehenden 60 ml Glas-Teflon-Potter-Elvehjem-Homogenisator.

Alle Arbeitsschritte wurden in Eiswasser mit einer Pause von jeweils 10 sek durchgeführt, um eine Erwärmung durch die Reibung zu verhindern.

II.2.2. Fraktionierte Zentrifugation

In einem Vorversuch (siehe Abb. 1 und Tab. 1) wurden ein 500 g Sediment, aus dem Überstand ein 5.000 g Sediment und aus dem Überstand des 5.000 g Sedimentes ein 25.000 g Sediment erstellt. Dabei zeigte das 5.000 g Sediment die günstigste Adenylzyklaseaktivität. Im folgenden wird die Herstellung eines 5.000 g Sedimentes beschrieben. Dieses Sediment wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Das Schilddrüsenhomogenat wurde in einer Sorvall Höchstgeschwindigkeitszentrifuge RC- 2-B mit 2.000 UPM (ca. 500 g) bei 4 C für 10 min im Festwinkelrotor SS 34 zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei 6.000 UPM (ca. 5.000 g) für 20 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in etwa 100 ml 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,4 bei 25 C, aufgeschwemmt und erneut bei 5.000 g für 20 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in soviel 50 mM Tris-HCl Puffer aufgenommen, daß der Proteingehalt bei etwa 1 mg/ml lag (ca. 30 ml). Das Homogenat wurde in flüssigem Stickstoff bei -196 C in Röhrchen à 2 ml eingefroren, ein kleiner Teil wurde für die Proteinbestimmung nach Lowry aufbewahrt. Die eingefrorenen Membranen zeigten über 6 Monate keinen Aktivitätsverlust.

Zur Aufbewahrung der Membran wurde auch die Gefriertrocknung getestet. Die Membran behielt in diesem Fall die Fähigkeit, TSH zu binden, verlor allerdings die Adenylzyklaseaktivität. Die Gefriertrocknung eignet sich somit nur zur Aufbewahrung der Membranen für den RRA. Nach August 1980 hergestellte Membranen wurden in einem -70 C Gefrierschrank aufbewahrt.

Diese Membranen zeigten verglichen mit den Stickstoff-gekühlten Membranen keinen Aktivitätsverlust.

II.3. Inkubationsansatz zur Adenylzyklasestimulation (Stimulationsassay)

Ziel der vorliegenden Arbeit ist u.a. die Entwicklung und Optimierung eines Assays zum Nachweis Schilddrüsenadenylzyklase-stimulierender Immunglobuline im Serum.

Ausgegangen wurde von folgender Standardinkubation:

1. 70 μ l Stimulator (z.B. TSH, Serum, GTP und auch Kombinationen dieser Substanzen)
2. 20 μ l ATP (mit oder ohne GTP-Zusatz)
oder
10 μ l ATP (mit oder ohne GTP-Zusatz) und
10 μ l Kreatinphosphat (CP) und Kreatinkinase (CK),
wenn der Einfluß eines ATP-regenerierenden Systems getestet werden sollte.
3. 60 μ l Inkubationspuffer, enthaltend $MgCl_2$ und
eventuell Theophyllin
4. 50 μ l Membransuspension

Alle Substanzen wurden in 50 mM Tris-HCl, $pH_{25\text{ }^{\circ}\text{C}} = 7,4$ gelöst.

Die Membransuspension wurde mit Stimulator (z.B. Serum oder TSH) und ATP als Substrat für eine bestimmte Zeit und bei einer bestimmte Temperatur inkubiert.

Die Konzentrationen der Substanzen im Inkubationsansatz waren, wenn nicht anders aufgeführt:

Tris-HCl 50 mM, Mg^{++} 5 mM, ATP 2,5 mM, Membranprotein 0,05 - 0,375 mg Protein/ml Ansatz, CP 10 mM, CK 0,35 mg/ml, Theophyllin 10 mM, GTP 0,1 mM.

Die variablen Inkubationsbedingungen, wie Temperatur, Inkubationszeit, sowie die Zugabe der Substanzen CP, CK, Theophyllin und GTP, werden im Ergebnisteil im Rahmen der einzelnen Versuche aufgeführt.

Die Inkubation wurde durch Zugabe der Membransuspension gestartet und durch Erhitzen auf 90 C für 4 min gestoppt. Anschließend wurden 800 μ l 0,05 M Natriumazetatlösung, pH 6,2, zugegeben. Bei den Versuchen, in denen als Stimulator Serum eingesetzt wurde, wurde zuerst Natriumazetat zugegeben und dann erhitzt, da der Inkubationsansatz bei der Denaturierung zu stark eindickte.

Nach Abtrennung der denaturierten Eiweiße durch Zentrifugation wurden 2 x 50 μ l bis 2 x 300 μ l des Überstandes für den cAMP-RIA eingesetzt (Doppelbestimmungen).

II.4. cAMP-Radioimmunoassay

Zur Bestimmung der cAMP-Konzentration wurde ein RIA-Kit der Firma Becton Dickinson eingesetzt. Dieser RIA nach der Methode von Steiner et al. (20) arbeitet mit 2-O-Succinyl cAMP-Tyrosinmethylester (125 I) als Tracer. Die Separation von gebundenem und freiem Hapten erfolgt bei diesem Kit durch präzipitierende 60%-gesättigte Ammoniumsulfatlösung. Dieser Test ist hoch spezifisch für GTP; so beträgt z.B. die Kreuzreaktivität mit cGMP lediglich 0,016%.

Für den Assay wurden 50-300 µl des Inkubationsansatzes eingesetzt. Jede Bestimmung erfolgte zweifach. Die Aktivitätsmessung erfolgte im Packard-γ-Counter-Probenwechsler.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde die Bindung des Tracers an den Antikörper (in % der Nullbindung) gegen die cAMP-Konzentration aufgetragen und eine Regressionskurve berechnet. Die Ermittlung der Regressionskurve und die Berechnung der Ergebnisse erfolgte durch einen Rechner.

Eine weitere Methode der cAMP-Bestimmung nach Salomon (21) beruht auf der Bildung von (^{32}P)-cAMP aus ^{32}P -markiertem ATP und anschließender sequenzchromatographischer Separation. Diese Methode ergab in Vorversuchen gleiche Ergebnisse wie der RIA; wegen der umständlichen Handhabung und der hohen Aktivität des verwendeten Nuklids wurde dem RIA-Kit der Vorzug gegeben.

II.5. Statistik

Jeder Inkubationsansatz wurde dreifach durchgeführt und jeder Ansatz im RIA doppelt bestimmt. Da die Variationsbreite der Ergebnisse hauptsächlich durch die Variation in den Inkubationsansätzen bestimmt wird, wurden in den Kurven (Ergebnisteil) die Standardabweichungen für die Dreifachinkubationen eingezeichnet. Bei einigen Abbildungen sind die Standardabweichungen aus graphischen Gründen (Übersichtlichkeit) weggelassen. Die Berechnung der linearen Regression und des Korrelationskoeffizienten r erfolgte durch einen Rechner.

II.6. Bestimmung der Membrankonzentration

Es wurde davon ausgegangen, daß die Proteinkonzentration der Membransuspension direkt mit der Membrankonzentration korreliert. Zur Proteinbestimmung wurde die Folin-Phenolmethode nach Lowry verwendet (22).

II.7. Präparation von Immunglobulin G

Die Anreicherung von Immunglobulin G aus Humanserum wurde durch Fällung mit Ammoniumsulfat nach einer modifizierten Methode von Weir (23) durchgeführt. Der Dialysepuffer enthielt in Abänderung des Verfahrens 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, bei 25 C.

II.8. Dialyse von Humanseren

Zur Ausschaltung unspezifischer Effekte auf die cAMP-Produktion, wie z.B. unterschiedlich hoher Kalzium- und Magnesiumkonzentrationen, wurde eine Dialyse der Humanseren durchgeführt. 2 - 5 ml Serum wurden in Dialyseschläuchen der Fa. Union Carbide Corporation gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,4_{25 C}, für etwa 48 h bei 4 C dialysiert. Die Gesamtkalzium- bzw. Magnesiumkonzentrationen lagen danach bei etwa 0,02 mM (atomabsorptionsspektrographische Messung im Zentrallabor des Klinikum Steglitz, Dir. Prof. Dulce).

II.9. Patienten

Zur Berechnung der Korrelation zwischen TSAb und TBIAb wurden Seren von Patienten mit bilateral diffus speichernder Schilddrüse und Hyperthyreose getestet. Eine Korrelationsberechnung wurde unabhängig von der medikamentösen Therapie einer Hyperthyreose, einer Schilddrüsenoperation oder einer Radiojodresektion durchgeführt. Primär wurde bei allen Seren TBIAb bestimmt, dann erfolgte je nach Versuch eine Auswahl oder Zufallsauswahl von Seren mit nachfolgender TSAb-Bestimmung.

II.10. Materialien

ATP	-	Sigma Chemie GmbH A 2383
GTP	-	Sigma Chemie GmbH G 5881
GppNHp	-	Sigma Chemie GmbH G 0635
TSH	-	Thyreostimulin ^R , Fa. Organon
CP, CK	-	Boehringer Mannheim GmbH
Tris	-	Fa. Merck, Darmstadt
MgCL ₂	-	Fa. Merck, Darmstadt
Theophyllin	-	Fa. Merck, Darmstadt
cAMP-RIA	-	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

III. ERGEBNISSE

A. Entwicklung und Optimierung eines Assays für schilddrüsen-stimulierende Antikörper

1. Herstellung einer Schilddrüsenmembransuspension mit TSH-stimulierbarer Adenylzyklaseaktivität und Optimierung der Inkubationsbedingungen.

Voraussetzung für unsere Untersuchungen ist die Herstellung einer Schilddrüsenmembransuspension mit TSH-stimulierbarer Adenylzyklaseaktivität. Zu diesem Zweck wurden Schilddrüsen mechanisch zerkleinert (siehe Methodik) und durch Zentrifugation weiter fraktioniert. In den jeweiligen Fraktionen wurde die basale und die durch Stimulation mit TSH, F^- und GppNHp erzielte Stimulation gemessen.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis der fraktionierten Zentrifugation und der nachfolgenden Stimulierungsversuche zusammenfassend dargestellt. Deutlich wird, daß alle Fraktionen TSH-stimulierbare spezifische Adenylzyklaseaktivität enthalten.

Die 5.000 und 25.000 g Sedimente zeigen den deutlichsten TSH-Effekt auf die cAMP-Produktion. Abb. 1 zeigt den direkten Vergleich beider Sedimente. Da der TSH-Effekt im 5.000 g Sediment deutlicher als im 25.000 g Sediment ausfällt, wurde für alle weiteren Untersuchungen das 5.000 g Sediment benutzt.

Der Stimulator Fluorid wurde eingesetzt, weil er die Adenylzyklase maximal stimuliert, auf das GTP-Analogon GppNHp wird unten noch ausführlich eingegangen.

1.a. Vergleich der Adenylzyklaseaktivitäten in verschiedenen Sedimenten

Aus einer Schilddrüse wurde durch fraktionierte Zentrifugation ein 500 g, 5.000 g und ein 25.000 g Sediment hergestellt. Um die für unsere weiteren Untersuchungen optimal stimulierbare Fraktion zu finden, wurde die Abhängigkeit der cAMP-Produktion von TSH, GppNHp und Fluorid getestet (Tab. 1 und Abb. 1).

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	37	-

Tabelle 1: Ergebnis der fraktionierten Zentrifugation und der Stimulierungsversuche

Ergebnis der fraktionierten Zentrifugation

	Proteinkonz. (mg·ml ⁻¹)	Volumen (ml)	Proteingehalt (g) (%)	spezifische Enzymaktivität (pmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)				Gesamtenzymaktivität (μmol · min ⁻¹) und [%]			
				basal	TSH	GppNHp	F	basal	TSH	Gpp NHp	F
Homogenat	12	310	3,72 100	1,6	2,9	19,6	47	5,9 100%	10,7 100%	73 100%	175 100%
500 g	2,5	45	0,11 3	3,5	10,2	63,4	156	0,4 7%	1,1 10%	7 10%	17 10%
5000 g	3,5	55	0,16 4	6,0	17,4	112	312	1,0 17%	2,8 26%	18 25%	50 28%
25000 g	2,0	36	0,07 2	9,1	17,0	131	212	0,7 12%	1,3 12%	10 14%	15 9%
Überstand	13,0	260	3,38 91	0,8*	1,6*	11*	27*	2,8* 64%	5,5* 52%	38* 51%	93* 53%

*errechnete Werte:

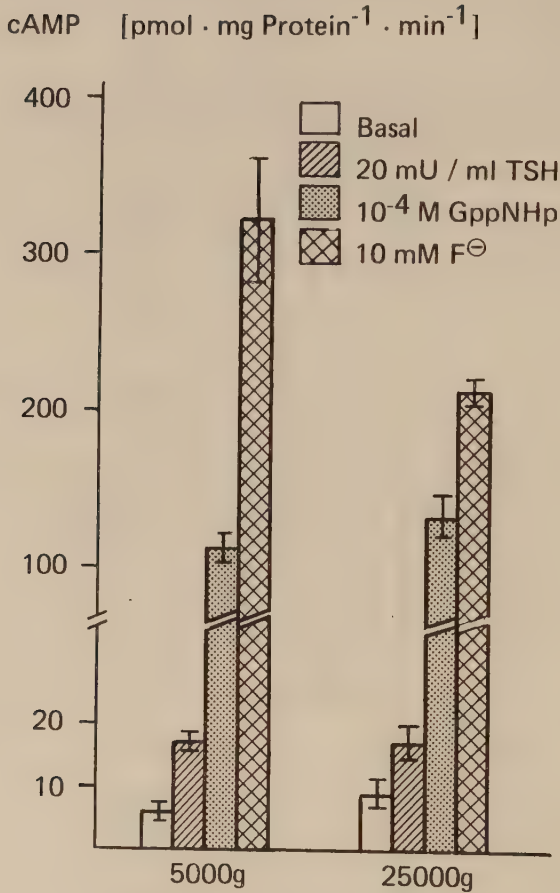


Abb. 1: Direkter Vergleich der Stimulierbarkeiten des 5.000 g und 25.000 g Sedimentes

Beide Sedimente sind durch TSH, F⁻ und GppNHp deutlich stimulierbar, insgesamt ist der Effekt von TSH im 5.000 g Sediment deutlicher.

Mit dem 5.000 g Sediment wurden eine Reihe von Versuchen zur Optimierung der Inkubationsbedingungen durchgeführt.

1.b. Abhängigkeit der cAMP-Konzentration von der Membrankonzentration mit und ohne Stimulation durch 10 mU/ml TSH

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	37	-

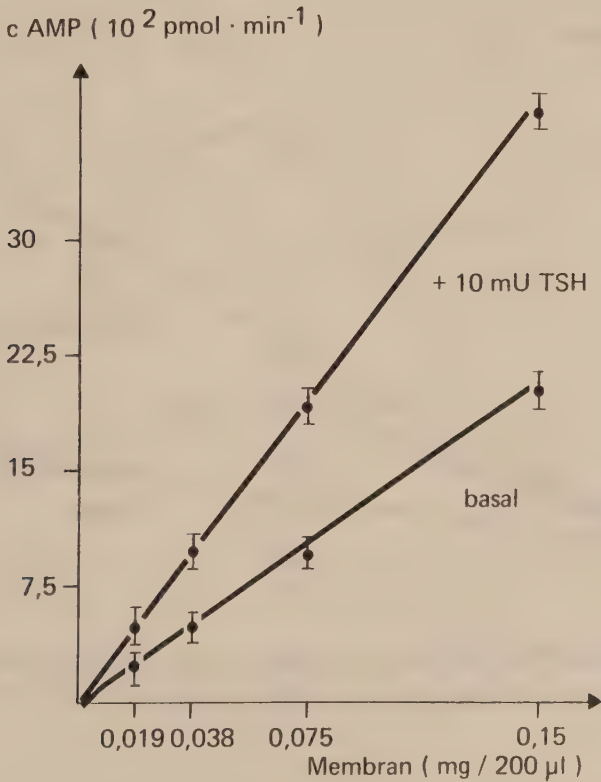


Abb. 2: Die cAMP-Produktion verhält sich im getesteten Bereich nahezu linear proportional zur Membrankonzentration.

1.c. Basale und TSH-stimulierte Adenylzyklaseaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	-	37	-

cAMP (pmol · mg⁻¹)

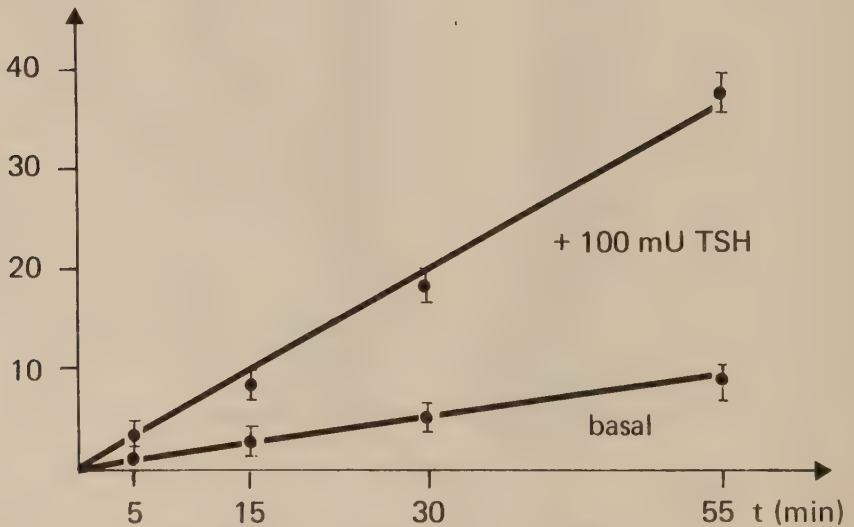


Abb. 3: Die cAMP-Produktion verhält sich im getesteten Bereich nahezu linear proportional zur Inkubationszeit.

1.d. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die basale und TSH-stimulierte Adenylzyklaseaktivität

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	-	-

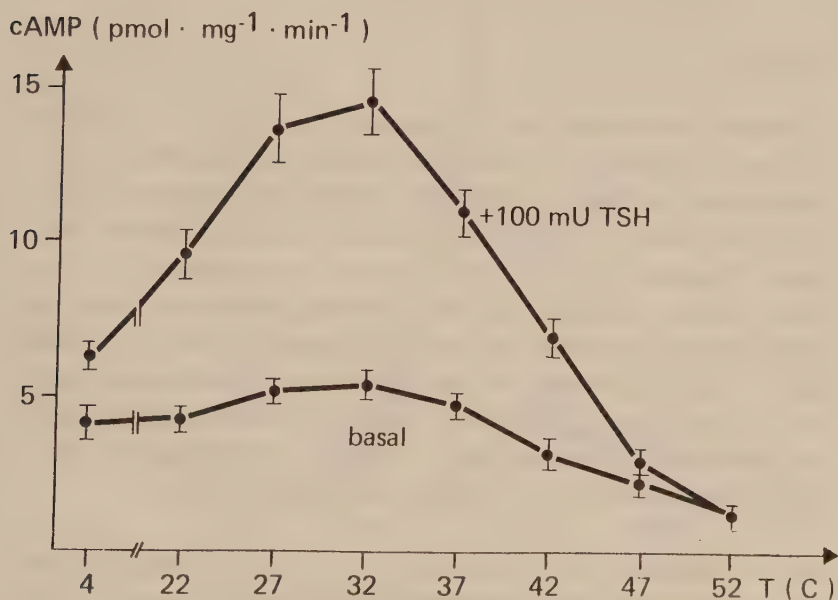


Abb. 4: Sowohl die Basalaktivität als auch die TSH-stimulierte Aktivität zeigen ein Maximum bei 32 C.

1.e. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration (pH) auf
die basale und TSH-stimulierte AC-Aktivität

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	32	-

Methodik:

Es wurden Tris-Puffer mit 7 verschiedenen pH-Werten zwischen 5,0 und 9 eingestellt. Nach dem im Teil II (Methodik) beschriebenen Verfahren wurden die Inkubationsansätze unter Verwendung dieser Tris-Puffer pipettiert. Statt eines dreifachen Ansatzes wurde ein sechsfacher Ansatz gewählt. 3 Ansätze wurden inkubiert, in den anderen 3 Ansätzen wurde mit einer dünnen Elektrode der pH-Wert gemessen. Nach der Inkubation wurde der pH-Wert in den inkubierten Ansätzen mit dem vorher gemessenen verglichen, um pH-Unterschiede, die durch die Inkubation entstanden sein könnten, festzustellen. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied.

Dieses Verfahren wurde gewählt, da die geringe Pufferkapazität der Tris-Lösung bei pH-Werten um 5 keine exakte Einstellung des pH-Wertes möglich machte.

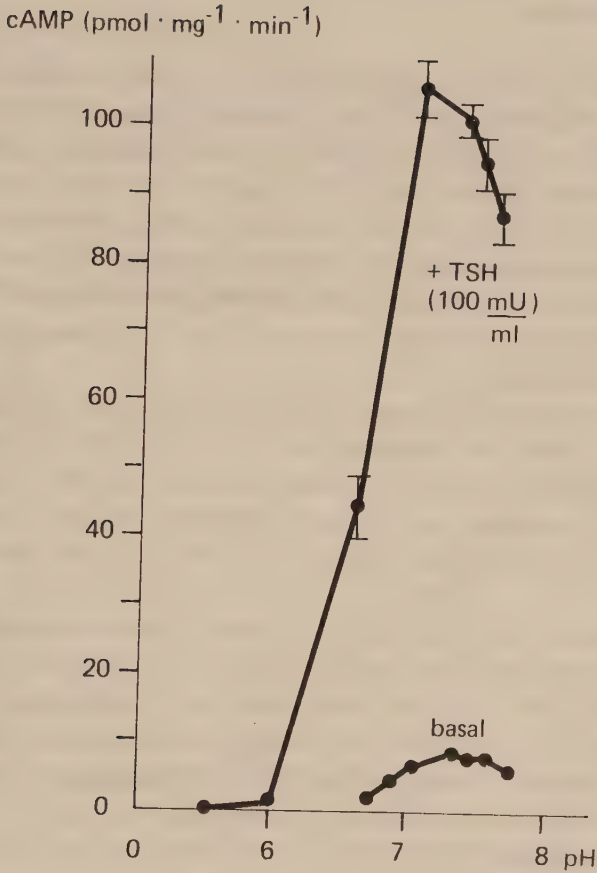


Abb. 5: Einfluß des pH-Wertes auf die basale und TSH-stimulierte Adenylzyklaseaktivität

Das Optimum der TSH-Stimulation liegt bei einem pH-Wert von 7,1, das Optimum der basalen cAMP-Produktion bei etwa 7,4. Für die weiteren Untersuchungen wurde der pH-Wert von 7,4 beibehalten.

2. Einfluß von TSH auf die Adenylzyklase und Vergleich der stimulatorischen Potenz verschiedener Thyreotropinpräparationen

Die in unserem Labor gebrauchte bovine Thyreotropinpräparation heißt Thyreostimulin^R (Fa. Organon). Diese TSH-Präparation stimuliert die Adenylzyklase je nach Membranpräparation ab einer Konzentration von 0,1 - 1 mU/ml (Abb. 6a). Die maximale Stimulation beträgt je nach Membranpräparation und Inkubationsbedingungen zwischen 300 und 1.000% bei einer Dosis von 1.000 mU/ml. Bei noch höheren TSH-Konzentrationen (meist etwa 10.000 mU/ml) ist ein leichter Abfall der Stimulierbarkeit zu beobachten.

In Abb. 6b ist die Lineweaver-Burk-Auftragung der Ergebnisse aus Abb. 8 (ohne ARS) dargestellt. TSH führt zu einer deutlichen Zunahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{Max}), die leichte Erhöhung von K_M durch TSH weist auf eine geringe Abnahme der Affinität des Enzymes zum Substrat ATP unter TSH hin.

Thyreostimulin^R ist eine relativ "crude" Thyreotropinpräparation mit einer Aktivität von 0,5 mU/ml. Zur Erzielung einer höheren Aktivität und zur Beseitigung evtl. vorhandener störender Einflüsse von niedermolekularen Beimengungen, führten wir eine gelchromatographische Trennung des Thyreostimulins^R über eine G-50-Sephadex-Säule durch (Abb. 7a).

Beide Thyreostimulinfraktionen (Peak I und II) und nicht aufgetrenntes Thyreostimulin^R wurden mit einem hochgereinigten TSH (Dr. Pierce, Los Angeles) verglichen. Unter der Annahme einer Aktivität des Dr. Pierce-TSH von 30 mU/ml zeigen sich zwischen Thyreostimulin^R, Fraktion I, und dem hochgereinigten TSH keine Differenzen (Abb. 7b). Die Stimulierung durch Fraktion II ist nicht dosisabhängig, Fraktion II scheint aber in Thyreostimulin^R die TSH-Wirkung nicht zu modifizieren. Für die weiteren Versuche wurde Thyreostimulin^R benutzt.

2.a. Einfluß von TSH auf die Adenylzyklaseaktivität

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	37	-

c AMP (pmol · mg⁻¹ · min⁻¹)

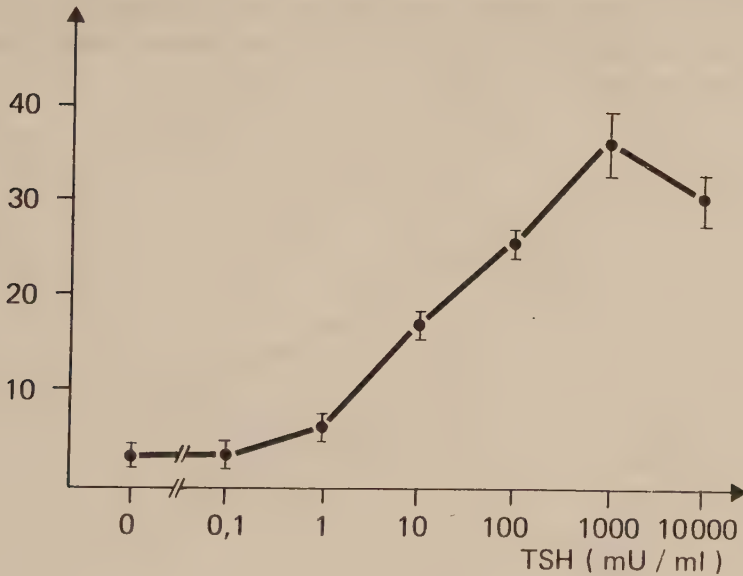


Abb. 6.a.

Die Empfindlichkeit und die maximale Stimulation durch TSH sind abhängig von der Membranpräparation. Die Empfindlichkeit liegt zwischen 0,1 und 1 mU TSH/ml Inkubationsansatz, die maximale Stimulation schwankt je nach Membran und Inkubationsbedingungen zwischen 300% und 1.000%.

Die unter den Inkubationsbedingungen II

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	37	-

durchgeführten Untersuchungen ergeben prinzipiell das gleiche Bild, d.h. einen Anstieg zwischen 0,1 und 1 mU TSH/ml. Lediglich die maximale Stimulation (prozentuale Stimulation des Basalwertes (0 mU TSH/ml)) ist unter den Inkubationsbedingungen II geringer.

2.b. Wechselwirkung zwischen TSH und dem Rezeptor-Adenylzyklasesystem

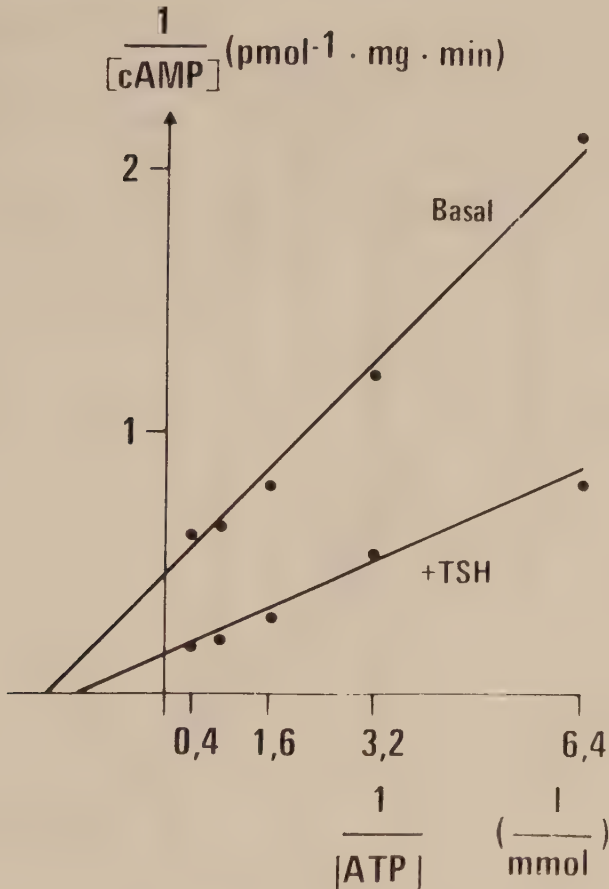


Abb. 6.b: Lineweaver-Burk-Auftragung der Ergebnisse aus Abb. 8 (ohne ARS)

V_{Max} -Basal	ca. 2 pmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹
V_{Max} -TSH	ca. 5 pmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹
K_M -Basal	ca. 6 · 10 ⁻⁴ mol/l
K_M -TSH	ca. 7 · 10 ⁻⁴ mol/l

2.c. Gelchromatographische Auftrennung von Thyreostimulin^R
über eine G-50-Sephadex Säule

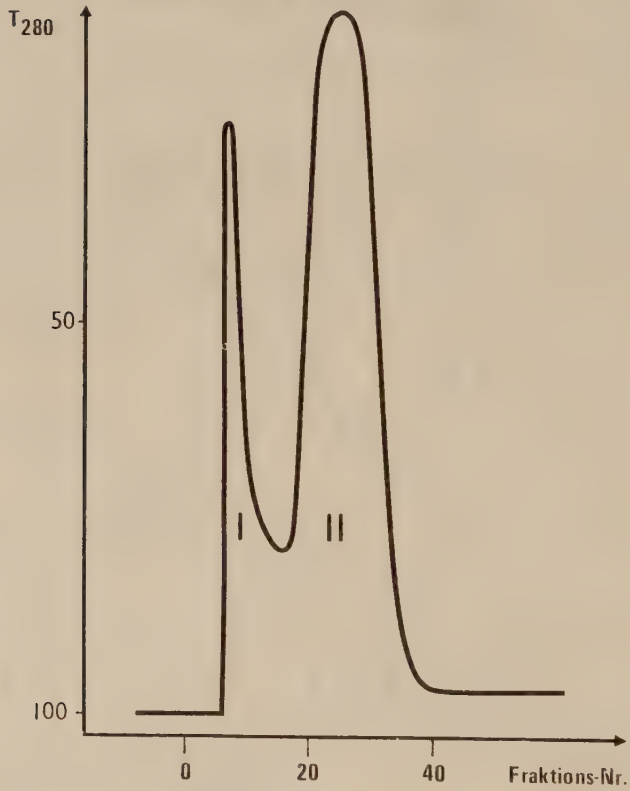


Abb. 7. a.

2.d. Vergleich der stimulatorischen Potenz verschiedener Thyreotropinpräparationen vom Rind

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	32	-

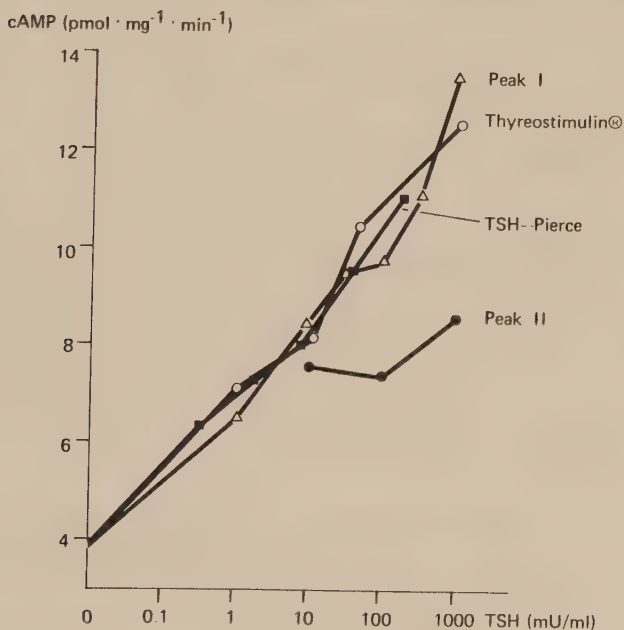


Abb. 7.b.

Thyreostimulin^R, Fraktion I (siehe Abb. 7a), sowie ein hochgereinigtes TSH (Dr. Pierce, L.A.) zeigen den gleichen Effekt auf die Adenylzyklase.

3. Beeinflussung von konkurrierenden enzymatischen Reaktionen um das Substrat (ATP) und das Produkt (cAMP) der Adenylzyklase
- a. Adenosintriphosphat wird durch die Adenylzyklase in Gegenwart von Mg^{++} zu cAMP umgebaut. Um das ATP konkurrieren jedoch noch andere Enzyme (z.B. Phosphatasen). Zur Sicherstellung der ATP-Konzentration ist ein ATP-regenerierendes System (ARS) üblich, bestehend aus Kreatinphosphat (CP) und Kreatinkinase (CK), welches nach der Reaktionsgleichung



entstandenes ADP zu ATP phosphorylieren soll.

Abb. 8 zeigt, daß bei einer Mg^{++} -Konzentration von 5 mM die Adenylzyklaseaktivität bei etwa 2,5 mM ATP im Inkubationsansatz unabhängig von dem Vorhandensein eines ARS am höchsten ist. Bis zu einer Konzentration von 0,67 mM ATP hat das ARS durchaus seine Berechtigung, bei höheren Konzentrationen liegt ATP im Überschuß vor, so daß der ATP-Abbau nicht ins Gewicht fällt.

- b. Das entstandene cAMP kann durch Phosphodiesterasen hydrolysiert werden und sich so dem radioimmunologischen Nachweis entziehen.

Theophyllin als Phosphodiesterasehemmer verhindert den Abbau von cAMP.

Es war zu klären, ob bei unserer Membranpräparation ein Zusatz von Theophyllin notwendig ist. Abb. 9 und 21 zeigen, daß Theophyllin eher einen inhibierenden Effekt auf die Adenylzyklaseaktivität hat. Eine Erhöhung der cAMP-Produktion (und damit ein "pseudo-stimulatorischer" Effekt ist nicht zu sehen). Auch wenn TSH statt in 50 mM Tris-HCl-Lösung, in dialysiertem Serum gelöst wird, hat Theophyllin einen leicht inhibierenden Einfluß (Versuch graphisch nicht dargestellt, im Inkubationsansatz zusätzlich GTP, Ergebnis analog Abb. 9).

3.a. Basal und TSH-stimulierte Adenylzyklaseaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit und ohne ATP-regenerierendem System (ARS)

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
(X)	X	15	32	-

cAMP (pmol · mg⁻¹ · min⁻¹)

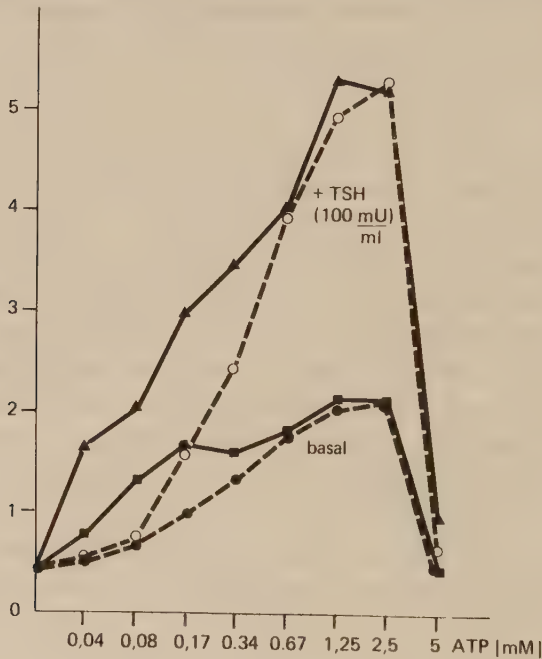


Abb. 8: gestrichelte Linie: ohne ARS

durchgezogene Linie: mit ARS

Nur bei geringen ATP-Konzentrationen hat das ARS einen Einfluß. Bei den von uns normalerweise verwendeten ATP-Konzentrationen von 2,5 mM ist das ARS ohne Einfluß.

3.b. TSH-Stimulierbarkeit der Adenylzyklase in Abhängigkeit eines Phosphodiesterasehemmers (10 mM Theophyllin)

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	(X)	15	32	-

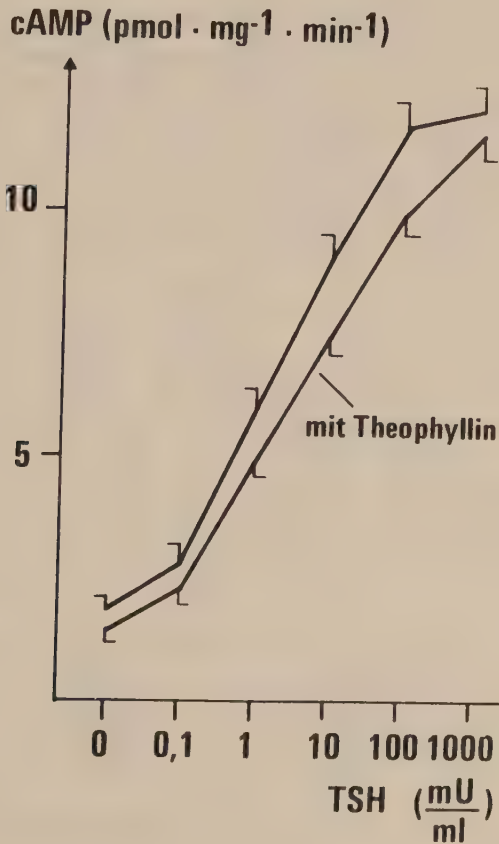
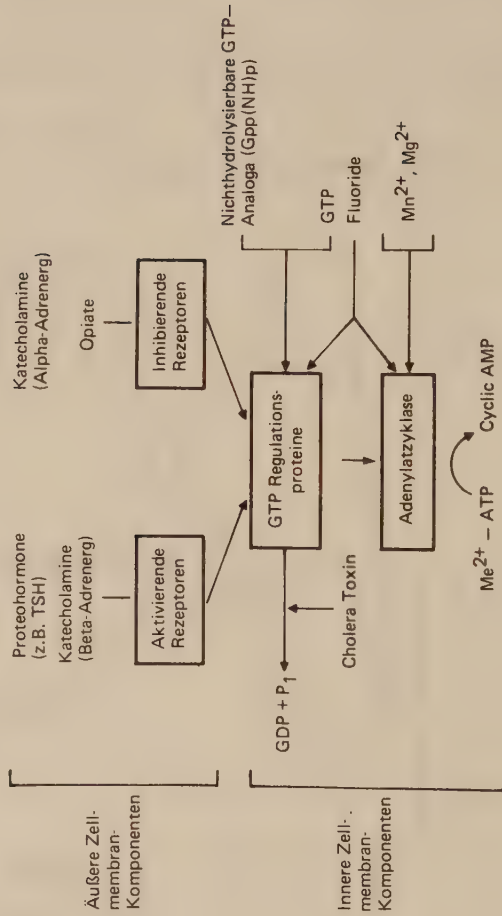


Abb. 10: Rezeptor - GTP - Adenylzyklasesystem



4. Einfluß von Guanylnukleotiden auf die Regulation der Adenylzyklase

Die Hormon-sensitiven Adenylatzyklase-Systeme stellen sich heute wesentlich komplizierter dar, als im Originalkonzept beschrieben:

Nach dem nun schon fast klassischen "Floating Receptor Model" von Cuatrecasas (25) und De Haën (26) besteht das AC-System aus 2 Proteinkomponenten, die in der Membran wie in einer Flüssigkeit "floaten" und frei diffundieren können. Die beiden Untereinheiten sind einmal die Rezeptoruntereinheit und zum anderen die katalytische Untereinheit. Beide Untereinheiten können in verschiedenen Konformationen vorliegen, und es wird nicht vorausgesetzt, daß eine stöchiometrische Beziehung zwischen den Proteinkomponenten bestehen muß. Wie in Abb. 10 schematisch illustriert, gibt es separate Rezeptoren (R) für jedes Hormon. Die Hormonbesetzung des Rezeptors beeinflußt bestimmte Effekte von Guanosintriphosphat (GTP), welches über mindestens 1, wahrscheinlich 2 GTP-Regulationsproteine wirkt. Diese wiederum steuern entweder Stimulation oder Inhibition der Adenylzyklase (C) und wirken auch auf den Rezeptor zurück.

Es gibt Hinweise darauf, daß neben den GTP-Regulationsproteinen weitere separate Untereinheiten vorhanden sind, die für die Regulation durch divalente Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) oder über eine sog. P-Bindungsstelle für die Regulation durch Adenosin verantwortlich sind.

Besonders die Regulation durch GTP über die GTP-Regulationsproteine ist seit den Pionierarbeiten von Rodbell et al. (27,28) an vielen Plasmazellmembranpräparationen untersucht worden (29,30).

Das GTP-ase-(Phosphohydrolase)-resistente Analogon von GTP, GppNhp, wurde von Londos et al. (31) u.a. als starker Stimulator einer TSH-abhängigen Adenylzyklase aus Rinderschilddrüsen

erkannt (32). Der durch GppNHp erreichte aktivierte Status der Adenylzyklase (AC) wurde von Spiegel als "holocatalytical state" bezeichnet (33). Schramm und Rodbell (34) zeigten einen durch Präinkubation von Erythrozytenmembranen mit GppNHp und Katecholamin "Persistant active state" der AC auf, der durch Betablocker, Detergentien und Sonisation nicht mehr zu inhibieren war.

Besonders gut wurde der GTP- bzw. GppNHp-Einfluß bisher auf die Glucagon-stimulierbare AC der Leber (27-29) und auf das Katecholamin-sensitive Enzym der Erythrozyten (35,36) und Lymphozyten (37) untersucht. GTP scheint nach diesen Ergebnissen über zwei sowohl funktionell (38) als auch räumlich getrennte Bindungsstellen zu wirken. Eine GTP-Bindungsstelle scheint mehr der Rezeptoreinheit (TSH-Rezeptor), eine mehr der katalytischen Untereinheit (Adenylzyklase) zugeordnet zu sein:

1. Eine Bindung von GTP oder GppNHp an die Rezeptor-assoziierte Bindungsstelle verursacht eine Abdissoziation des Hormons vom Rezeptor. Die Bindung ist für GTP und GppNHp reversibel (28,37,39,40). Diese Rezeptorregulation beinhaltet auch die Regulation des Kopplungsprozesses zwischen Rezeptor und Adenylzyklase.
2. Eine Bindung von GTP an die der katalytischen Untereinheit zugeordneten GTP-Bindungsstelle (GTP-ase-Regulation) verursacht einen Anstieg sowohl der basalen als auch der Hormon-stimulierbaren AC-Aktivität. Diese Stimulierung durch GTP ist nur vorübergehend, da eine mit dieser Bindungsstelle assoziierte GTP-ase das GTP zu GDP hydrolysiert, welches dann abdissoziieren kann (35,41,42). Nach Hydrolysierung des GTP's geht die cAMP-Produktion wieder auf den Ausgangswert zurück. Hormon und GTP wirken

also synergistisch, zuerst initiieren, dann beenden sie die Aktivierung der AC (siehe Abb. 29).

GppNHp als schlechtes Substrat der GTP-ase verursacht eine deutliche und irreversible Stimulation der AC (persistent active state), da es nur verlangsamt abgebaut werden kann.

Studien über die Aktion von GTP und GppNHp an anderen AC-Systemen, z.B. an der Nebennieren-AC, zeigten viele Gemeinsamkeiten mit denen über Glucagon- und Katecholamin-sensitiven Enzymen (43,44).

In einigen zellfreien Systemen ist GTP absolut erforderlich, um eine Hormonstimulierung der AC zu bewirken (37), in anderen Systemen werden unter GTP niedrigere Hormonkonzentrationen zur gleichen Stimulierung benötigt (39, 45), d.h. es wird eine Empfindlichkeitssteigerung für Hormon beobachtet. In anderen Systemen wiederum scheint GTP eine Stimulation der AC zu inhibieren (16).

Die Frage, ob GTP die Stärke des Stimulationseffektes durch TSH verbessern und die Empfindlichkeit des Systems für Hormon steigern könnte, veranlaßte uns, den Einfluß von GTP und seines Analogons GppNHp auf das Schilddrüsenadenylzyklase-System zu untersuchen.

Abb. 11 zeigt, daß GTP selbst einen schwachen stimulatorischen Effekt (180%) auf die Adenylzyklase hat. Die Kombination verschiedener GTP- und TSH-Konzentrationen zeigt Abb. 12. Es fällt auf, daß GTP nicht die Empfindlichkeit des Systems für TSH steigert, wohl aber den TSH-Effekt insgesamt verdeutlicht.

GppNHp ist ein GTP-ase resistentes Analogon von GTP. Wie Abb. 13 zeigt, hat es eine wesentlich höhere stimulatorische Potenz als GTP. Durch gleichzeitige Zugabe von GTP läßt sich der GppNHp-Effekt vollständig aufheben (kompetitive Wechselwirkung). Dies ist auch der Fall, wenn man die Zellmembran mit GppNHp ohne Substrat präinkubiert und bei der nachfolgenden Inkubation mit ATP steigende Mengen GTP zugibt (Abb. 14). Zusätzliche GppNHp-Gabe kann den Stimulationseffekt nach Vorinkubation mit GppNHp und nachfolgender Waschung noch erhöhen.

GppNHp führt nicht zu einer Empfindlichkeitssteigerung für TSH (Abb. 15). Es fällt auf, daß unter GppNHp die TSH-Basalwerte relativ stärker ansteigen als die durch 1.000 mU TSH/ml stimulierten Werte.

GppNHp führt also nicht wie GTP zu einer Verstärkung des TSH-Effektes, sondern eher zu einer Abschwächung.

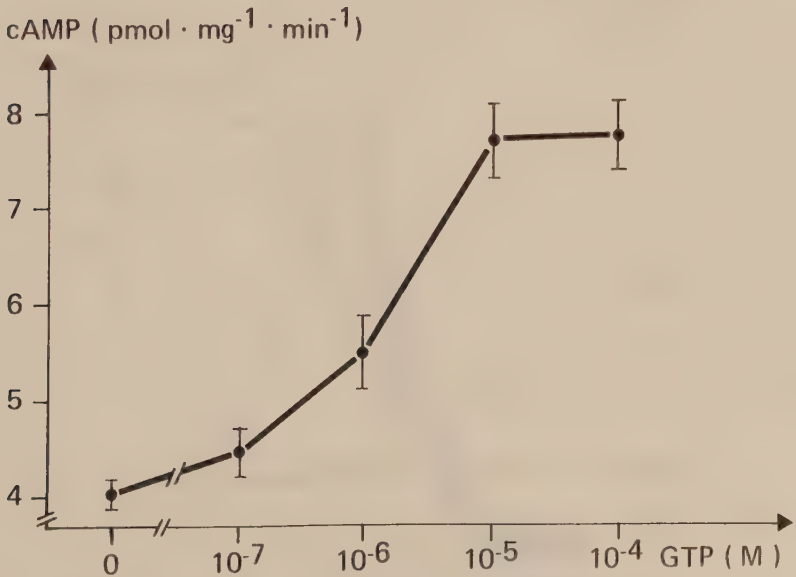
Auch eine Präinkubation der Schilddrüsenzellmembran mit GppNHp, nachfolgender Waschung und Inkubation mit TSH mit und ohne GTP-Zusatz, führt nicht zur Empfindlichkeitssteigerung für TSH (Abb. 16).

4.a. Einfluß von GTP auf die Adenylzyklase

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	15	32	

Dieser Versuch wurde auch ohne das ATP-regenerierende System durchgeführt. Es war keine Beeinflussung der GTP-Stimulation durch das ARS zu erkennen.



*Stimulation der Adenylcyclase durch GTP

4.b. Einfluß verschiedener GTP-Konzentrationen auf die
Stimulierung der Adenylzyklase durch TSH

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	-	15	32	

cAMP (pmol · mg⁻¹ · min⁻¹)

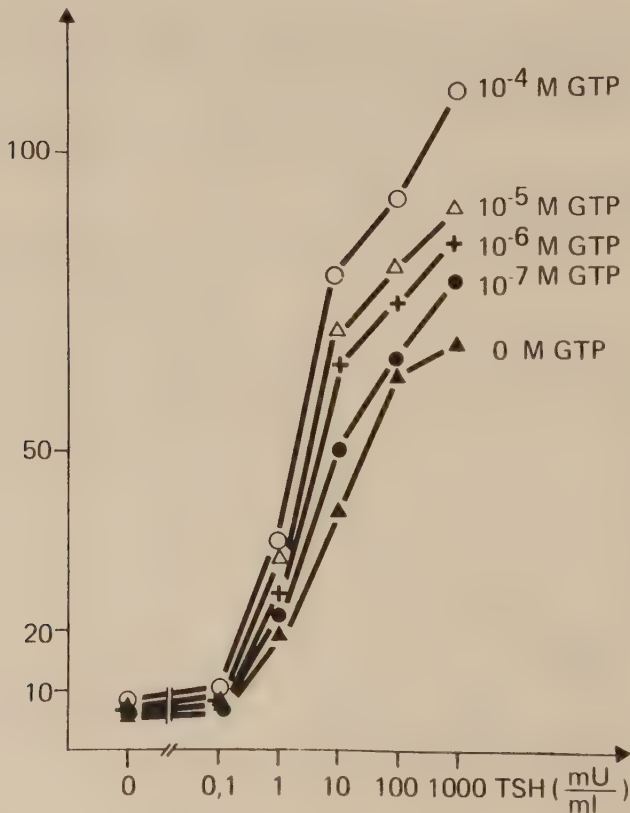


Abb. 12

4.c. Einfluß der Kombination verschiedener Konzentrationen von GTP und GppNHp auf die Adenylzyklase

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	-	15	32	-

Dieser Versuch wurde auch mit einem ARS und Theophyllin sowie mit Theophyllin alleine ohne ARS durchgeführt. Es zeigten sich keine Veränderungen der GppNHp- oder GTP-Wirkung.

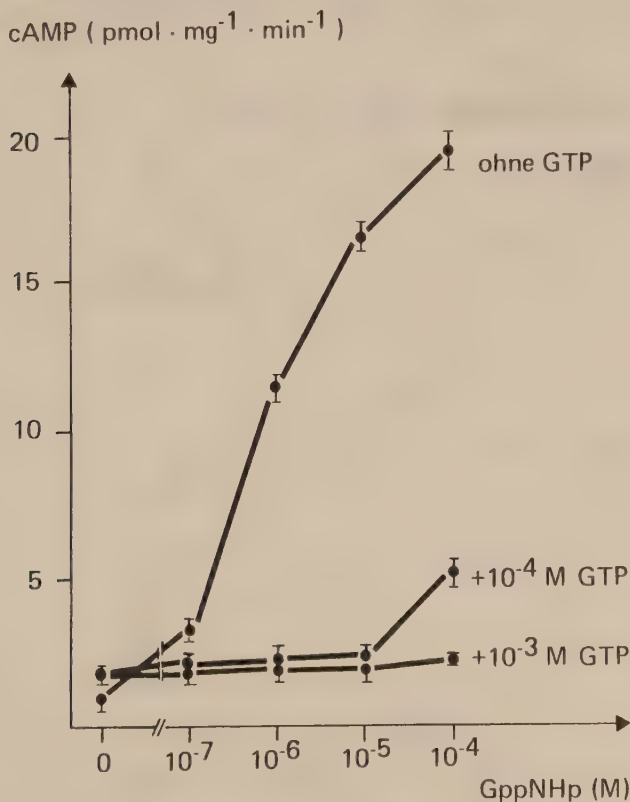


Abb. 13: GppNHp-Stimulierbarkeit der Adenylzyklase bei 2 verschiedenen GTP-Konzentrationen und ohne GTP

4.d. Einfluß von GTP bzw. GppNHp auf eine durch GppNHp präinkubierte Membran

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	-	15	32	-

Methodik:

Eine Membran wurde 30 min bei 32 C mit 0,1 mM GppNHp präinkubiert, anschließend 2 x in Tris gewaschen, zentrifugiert und dann mit GTP bzw. GppNHp im normalen Inkubationsansatz inkubiert.

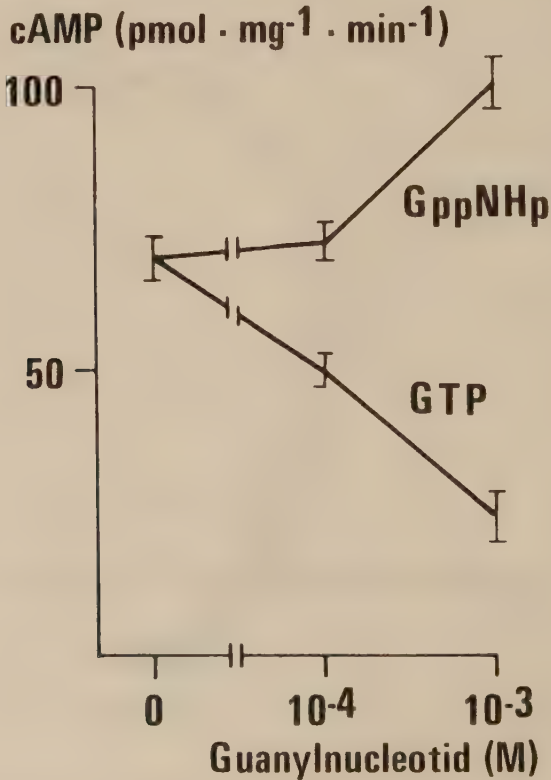
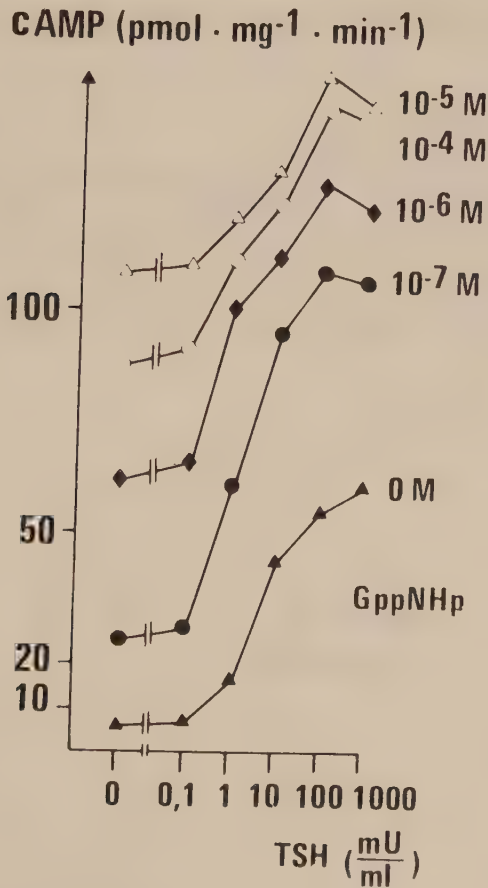


Abb. 14

4.e. Einfluß von GppNHp auf die Stimulation der Adenylzyklase durch TSH

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	-	15	32	-



4.f. Einfluß von GTP auf die TSH-Stimulierbarkeit einer durch GppNHp bzw. Tris-HCl präinkubierten Membran

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	-	15	32	

Methodik:

Eine Membranmenge wurde in 2 gleiche Fraktionen geteilt. Eine Fraktion wurde mit 10^{-4} M GppNHp in 50 mM Tris, pH = 7,4, die zweite Fraktion nur mit 50 mM Tris bei 32 C für 30 min präinkubiert. Beide Membranen wurden 2 x gewaschen und zentrifugiert und dann mit TSH und wahlweise 10^{-5} M GTP inkubiert.

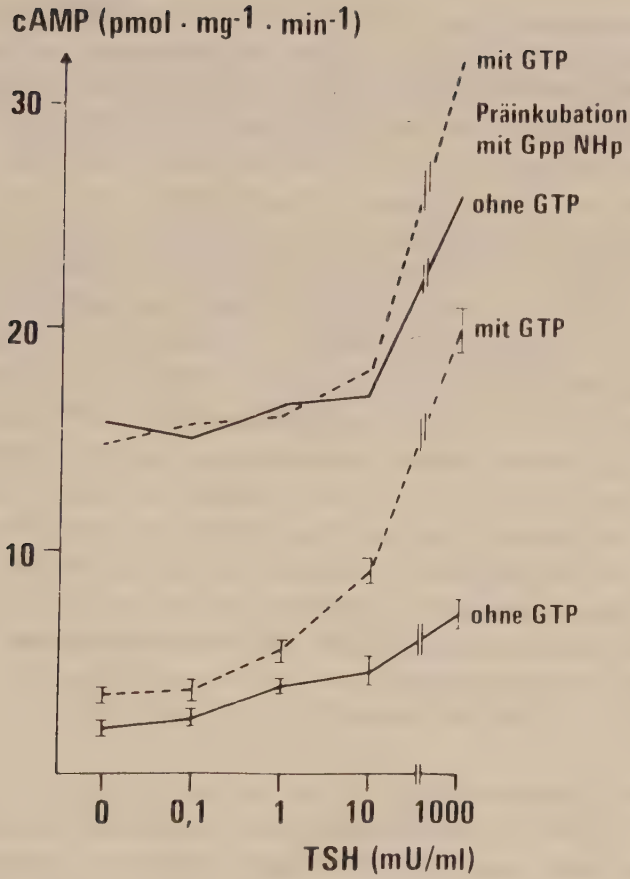


Abb. 16

5. Nachweis von Thyreoida stimulierenden Antikörpern (TSAb) im entwickelten TSH-sensiblen Adenylzyklase-Stimulationsassay

Zur Klärung der Frage, ob TSAbs direkt im Serum gemessen werden kann, wurden Ansätze mit jeweils unbehandeltem Serum, gegen Tris-HCl dialysiertem Serum und durch Ammoniumsulfat-Fällung gewonnene IgG-Fraktion inkubiert. Dabei wurde sowohl Serum einer TBIAb-positiven Patientin (V.S.) als auch Normalserum (J.H.) eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt. IgG und dialysiertes Serum von der Patientin V.S. stimulieren die Adenylzyklase bedeutend stärker als die Präparationen von der Normalperson. Mit dem unbehandelten Serum werden deutlich niedrigere Enzymaktivitäten gemessen, auch ist der Unterschied zwischen V.S. und J.H. nur minimal. Unpräpariertes Serum ist zum TSAbs-Nachweis nicht geeignet. In Abb. 19 und 20 wurden Immunglobuline und dialysierte Seren von Patienten mit diffus bilateral speichernder Schilddrüse und Hyperthyreose getestet, bei denen vorab TBIAb gemessen worden war. Auch hier ergibt sich kein Vorteil der Immunglobulinpräparation gegenüber dem dialysierten Serum. Auch wegen der komplizierteren und zeitaufwendigeren Methodik der IgG-Präparation wurde dialysiertes Serum für die nächsten Versuche eingesetzt.

Ab einer Inkubationszeit von 30 min ist bereits ein deutlicher Effekt von TBIAb positivem Serum vorhanden (Abb. 17). Ist der Adenylzyklase-stimulierende Effekt bei 30 min nicht zu sehen (Patientin LEI., Abb. 18) tritt er auch bei längerer Inkubationszeit nicht auf.

Wie unter III.A. in Abb. 9 dargestellt, hat Theophyllin bei einer Inkubationszeit von 15 min einen eher inhibierenden

Einfluß. Auch wenn wir, wie in Abb. 21, statt TSH dialysierte Seren einsetzen und die Inkubationszeit von 15 auf 90 min erhöhen, bleibt der leicht inhibierende Einfluß von Theophyllin bestehen.

Wir können daraus schließen, daß in dialysiertem Serum keine Phosphodiesteraseaktivität vorhanden ist, die den Einsatz von Theophyllin rechtfertigen könnte.

In einer Arbeit von Kleinman et al. (105) wird beschrieben, daß Präinkubation der Membran mit dem Serum und GTP die Empfindlichkeit des Systems für TSAb erheblich steigert. Abb. 22 zeigt, daß mit unserer Membranpräparation durch die Präinkubation die Membran eher inaktiviert wird. Je länger die Präinkubation, desto inaktiver die Adenylzyklase.

5.a. Vergleich der Adenylzyklasesstimulation durch verschiedene Serumpräparationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Unbehandeltes Serum, dialysiertes Serum und die Immunglobulinfraktion von einer Normalperson (J.H.) und einer TBIAb-positiven Patientin (V.S.) wurden auf die TSAb-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht.

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
X	X	-	32	-

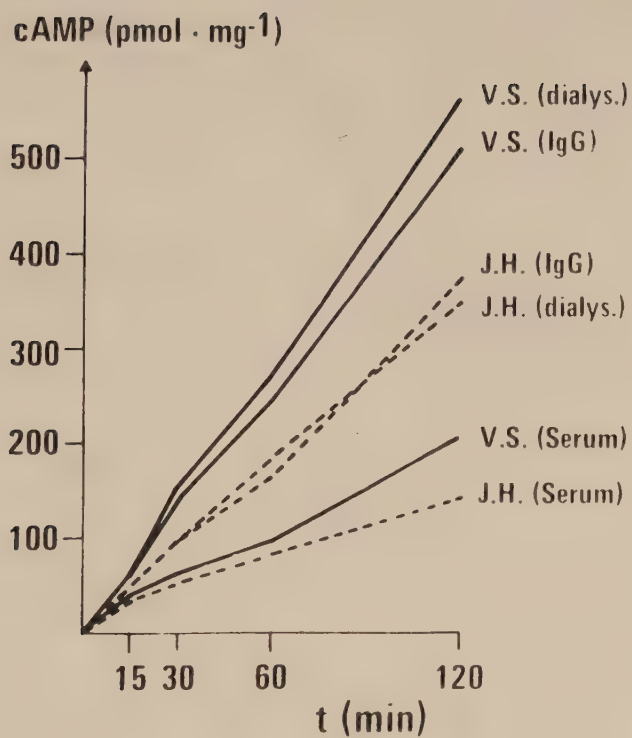


Abb. 17

5.b. TSAb-Aktivität in TBIAb-positiven dialysierten Seren und dialysierten Normalseren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

3 dialysierte TBIAb-positive Seren (MAN., SCH., LEI.) und 3 dialysierte Normalseren wurden auf ihre TSAb-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. In Abb. 18 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die Mittelwerte der Normalseren (BKK) eingetragen.

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
(X)	X	-	32	X

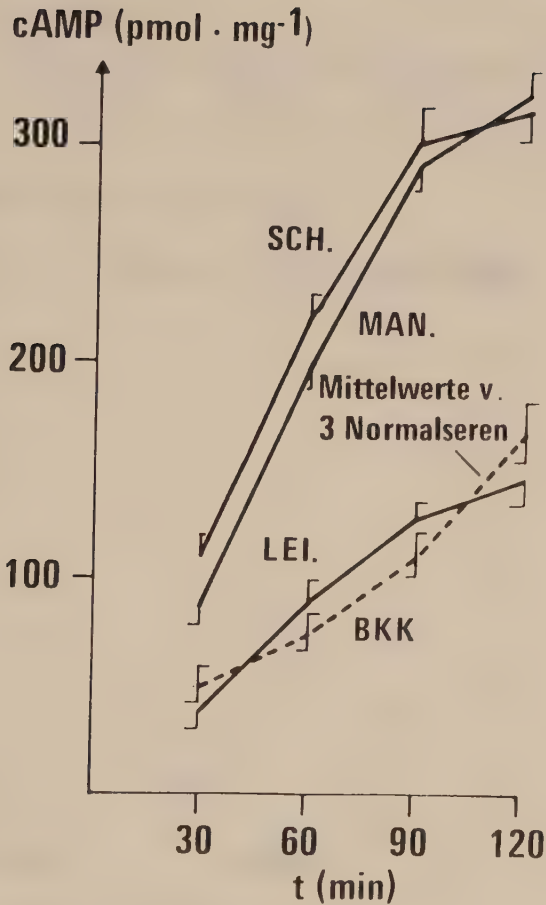


Abb. 18

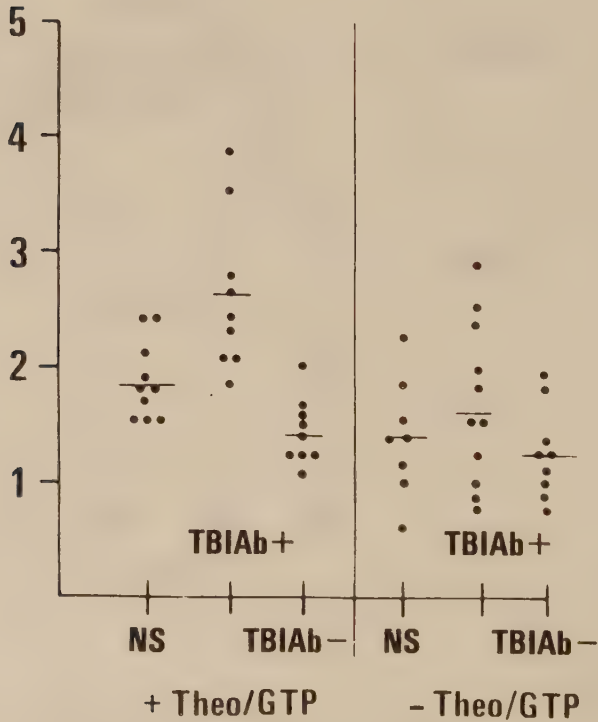
Dieser Versuch wurde auch mit einem ARS durchgeführt. Dabei zeigten sich keine prinzipiellen Unterschiede zum Versuch mit dem ARS, lediglich die Unterschiede zwischen den einzelnen Seren waren geringer.

5.c. TSAb-Aktivitäten in Immunglobulinpräparationen von
TBIAb-positiven und TBIAb-negativen Patientenseren
sowie von Normalseren

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	(X)	60	32	(X)

cAMP (pmol · mg⁻¹ · min⁻¹)

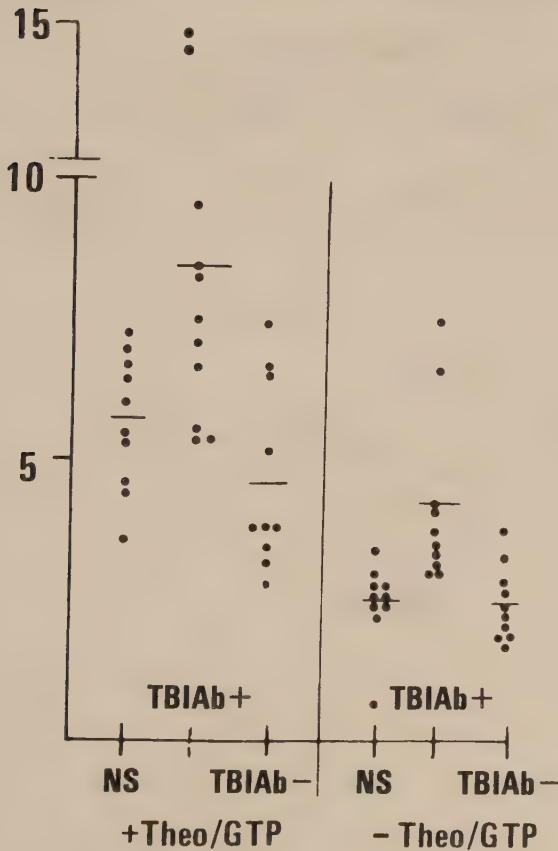


5.d. TSAb-Aktivitäten in dialysierten TBIAb-positiven und TBIAb-negativen Patientenseren sowie in dialysierten Normalseren

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	(X)	60	32	(X)

cAMP (pmol · mg⁻¹ · min⁻¹)



5.e. Stimulierbarkeit der Adenylzyklase in Abhängigkeit von Theophyllin

Bei 2 verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Wirkung von TSH, eines TBIAb-positiven Serums (SCH.), eines TBIAb-negativen Serums (JAN.) und von Tris-HCl auf die cAMP-Produktion in Abhängigkeit von Theophyllin untersucht.

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
-	(X)	15 bzw. 90	32	X

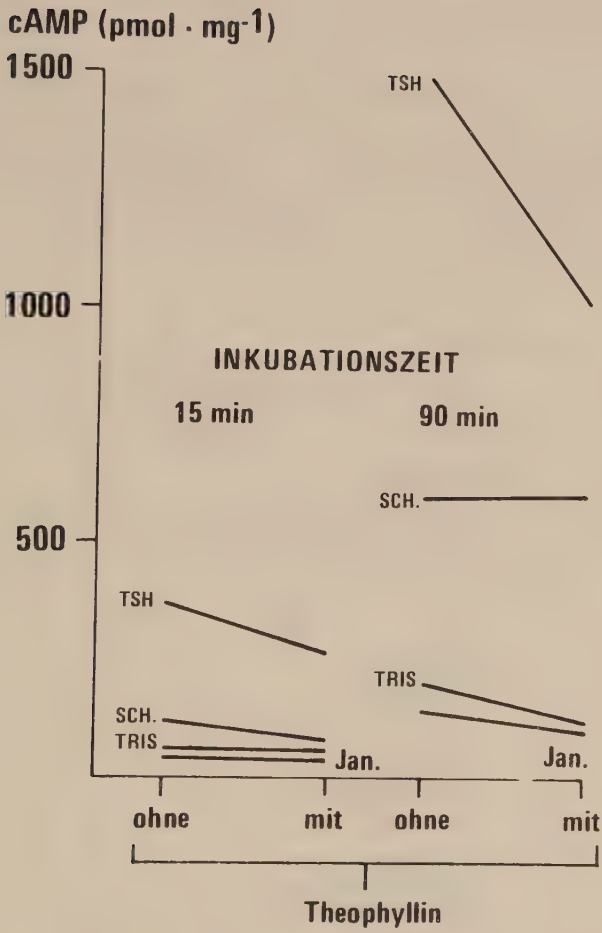


Abb. 21

5.f. Einfluß einer Präinkubation der Membran mit TSH oder dialysiertem Serum.

Die Membran wurde für eine bestimmte Zeit mit dem jeweiligen Stimulator präinkubiert (TBIAb-positives Serum = SCH., TBIAb-negatives Serum = LEI., 10 mU TSH/ml, Tris-HCl). Nach Start der Reaktion durch Zugabe von ATP erfolgte eine anschließende Inkubation von 30 - 60 min.

Inkubationsbedingungen:

ARS	Theophyllin	t (min)	T (C)	GTP
(X)	-	30 - 60	32	X

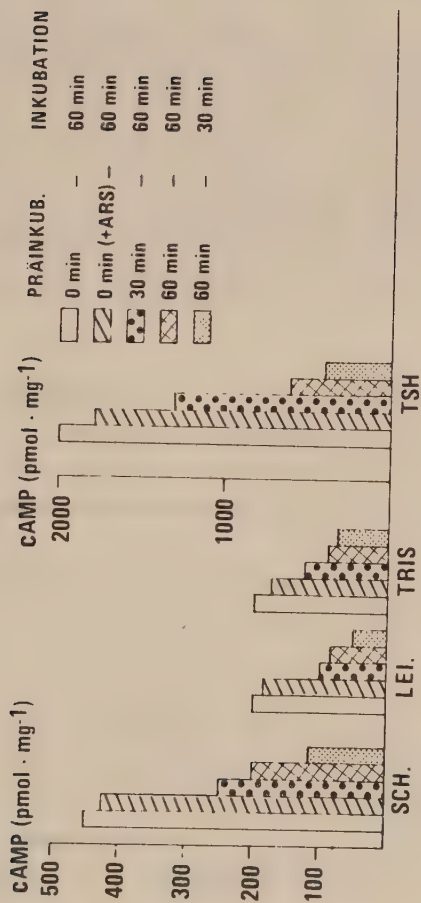


Abb. 22

B. Vergleich von TSAb- und TBIAb-Aktivität im Serum von Patienten mit Hyperthyreose und bilateral diffus speichernder Schilddrüse

In diesem Teil der Arbeit werden 2 Methoden zum Nachweis schilddrüsenstimulierender Antikörper (TSI) miteinander verglichen:

1. Der Radioligandenrezeptorassay (RRA) für TSH-binding inhibiting antibodies (TBIAb).

Im RRA wird die Inhibierung der Bindung von radioaktiv-markiertem TSH an den TSH-Rezeptor durch Immunglobuline ausgenutzt.

2. Der in Teil A entwickelte bzw. optimierte Stimulierungsassay für thyroid stimulating antibodies (TSAb).

Im TSAb-Assay wird die cAMP-Produktion der Adenylzyklase nach Stimulation durch Immunglobuline gemessen.

Folgende Methode wurde für die TSAb-Bestimmung eingesetzt:
(genaue Beschreibung in II.3. und III.A.)

70 µl Patientenserum, 60 µl Inkubationspuffer (Tris, Mg) und 50 µl Membran wurden mit 20 µl ATP/GTP-Lösung bei 32 C und einem pH von 7,4 für 60 min inkubiert. Entstandenes cAMP wurde radioimmunologisch bestimmt.

Die Konzentrationen im Inkubationsansatz waren:

2,5 mM ATP, 5 mM Mg, 0,1 mM GTP, 50 mM Tris-HCl.

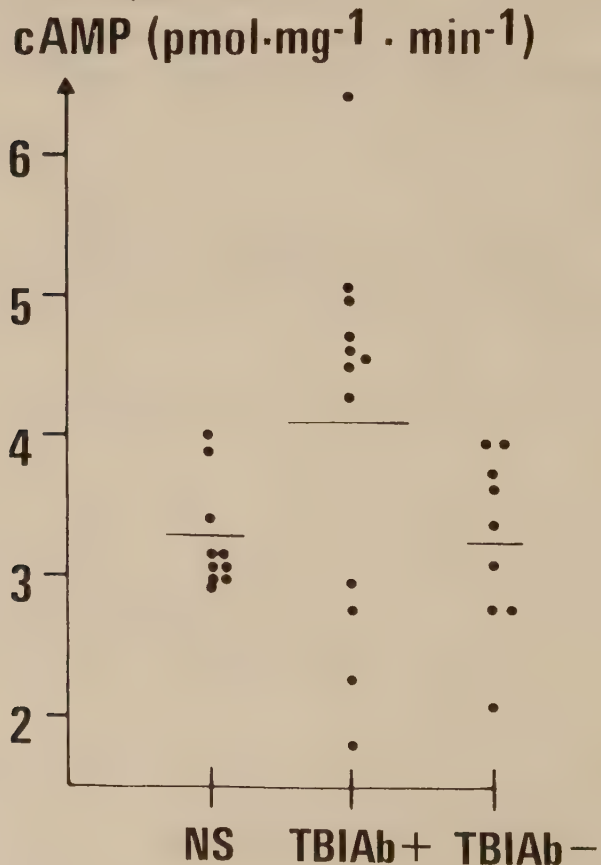
In den ersten beiden Versuchen wurden die Patientenseren in die Gruppen TBIAb positiv und TBIAb negativ eingeteilt. Bei diesen Gruppen wurde TSAb bestimmt. Abb. 23 (wie auch schon Abb. 19 und Abb. 20) zeigt, daß TBIAb positive Seren die

Adenylzyklase stärker stimulieren als TBIAb negative Seren. Es ist eine positive Korrelation festzustellen, die stärker wird, wenn nur TBIAb positive Seren berücksichtigt werden (Abb. 24) oder wenn die Testung der Seren in jeweils einem Assay erfolgt (Abb. 25).

In den folgenden 3 Versuchen wurden die TSAb- und TBIAb-Aktivitäten im Verlauf der Erkrankung bestimmt. Dabei zeigt sich bei 2 Patienten eine sehr gute Korrelation (Abb. 26 und 27) von TSAb und TBIAb, bei einer Patientin (Abb. 28) ist eine Dissoziation der Antikörperaktivitäten zu sehen.

- a. Vergleich der TSAb-Aktivitäten von 12 TBIAb-positiven und 9 TBIAb-negativen Seren von Patienten mit "toxic diffuse goiter". 10 Normalseren dienen als Vergleichsgruppe.

Sowohl die TSAb- als auch die TBIAb-Messung wurden in jeweils einem Assay, allerdings an 2 verschiedenen Schilddrüsenmembranen, durchgeführt.



b. Korrelation der in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse.

Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,74 bei Berücksichtigung der TBIAb-positiven Seren allein.

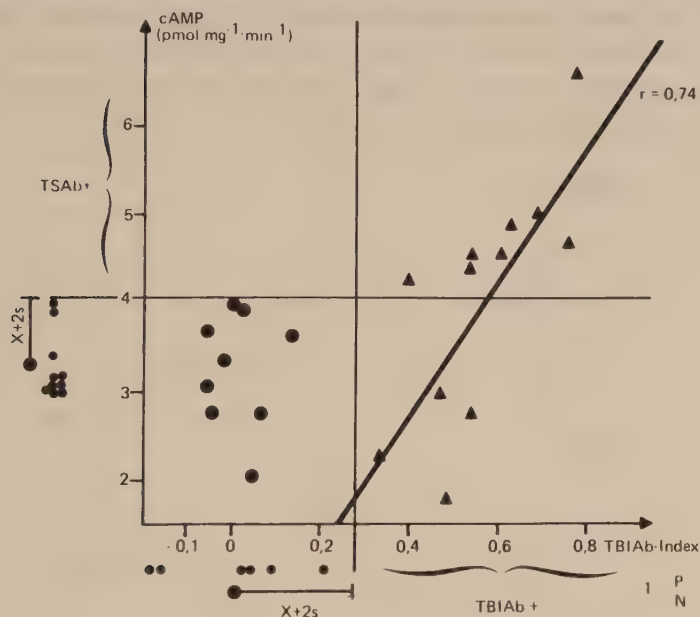


Abb. 24

Links von der Ordinate sind die cAMP-Produktionen von 10 Normalseren aufgetragen, unterhalb der Abzisse die Ergebnisse von 6 Normalseren im Radioligandenrezeptorassay. Als obere Normalgrenze wird für beide Assaysysteme der Mittelwert der Ergebnisse aus den Normalseren + 2 SD definiert.

In den folgenden Abbildungen ist der Mittelwert der cAMP-Produktion der Normalseren gleich 100% gesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Versuchen zu erreichen.

c. Korrelation zwischen TSAb und TBIAb bei 88 Seren von 48 Patienten mit "toxic diffuse goiter"

77 Seren (o) von 46 Patienten wurden in jeweils verschiedenen Assays bestimmt, während 11 Seren (*) von 2 Patienten (Verläufe) in jeweils einem TBIAb- und TSAb-Assay bestimmt wurden. Die Korrelation beträgt $r = 0,59$ bei den in verschiedenen Assays bestimmten 77 Seren und $r = 0,93$ bei den in einem gemeinsamen Assay bestimmten 11 Seren.

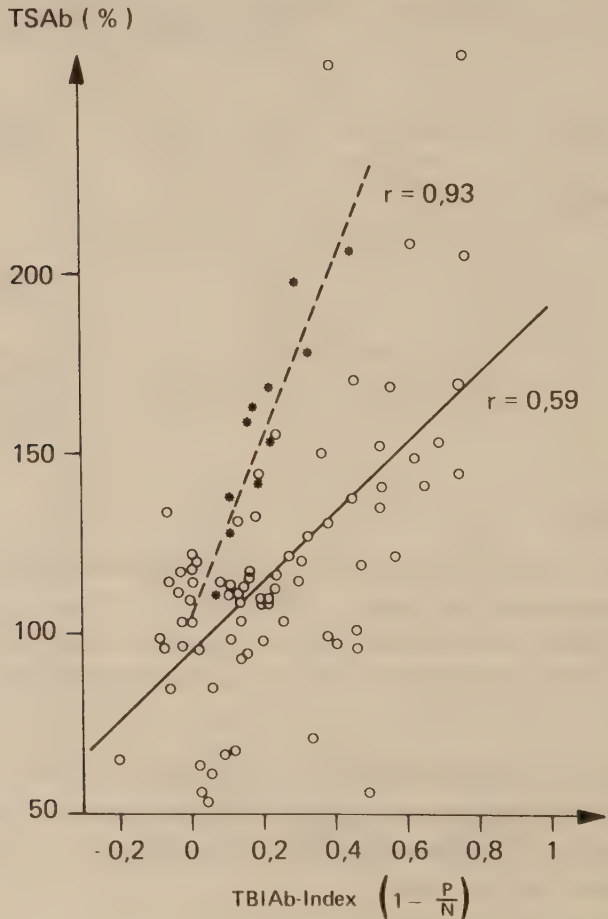


Abb. 25

26 Seren waren in beiden Assays positiv, d.h. ihr Wert lag oberhalb des Mittelwertes von mindestens 6 Normalseren plus zweifacher Standardabweichung. 39 Seren waren in beiden Assays negativ. 13 Seren waren TBIAb-positiv und TSAb-negativ (9) oder grenzwertig (4). 10 Seren waren TSAb-positiv und TBIAb-negativ (2) oder grenzwertig (8).

- d. Korrelation von TSAb und TBIAb im Verlauf einer Hyperthyreose und nach subtotaler Thyreoidektomie.

Beide Bestimmungen wurden in jeweils einem Assay durchgeführt, $r = 0,96$.

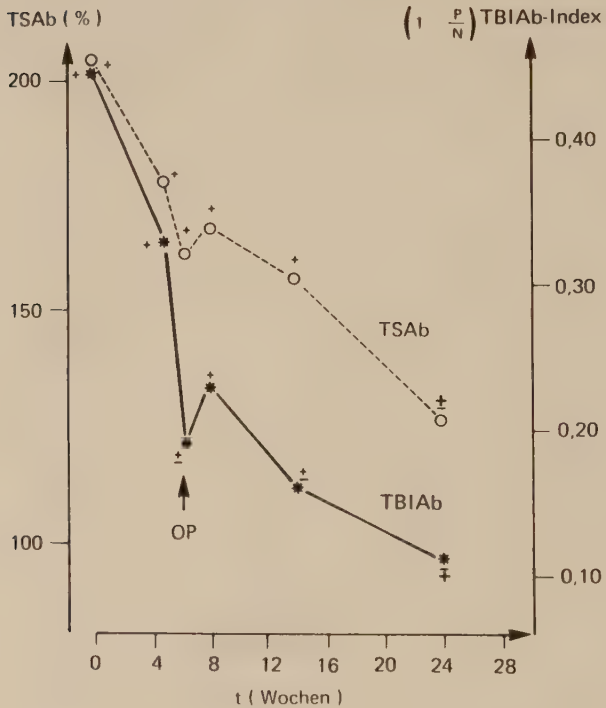


Abb. 26

e. Messung von TSAb mittels zweier verschiedener Membranen.

Bei einem Patienten wurden die TSAb-Bestimmungen insgesamt 3 mal durchgeführt (7I, 7II, 9), davon einmal mit einer zweiten Schilddrüsenmembran (2 Versuche mit Membran 7, 1 Versuch mit Membran 9). Die Verwendung unterschiedlicher Membranen ergibt keine prinzipiell unterschiedlichen Ergebnisse.

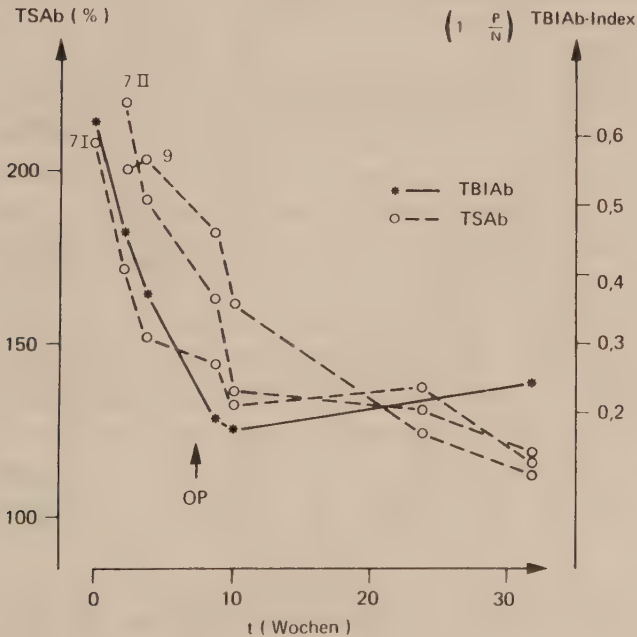


Abb. 27

f. Unterschiede im Verlauf von TSAb und TBIAb bei einer hyperthyreoten Patientin unter Therapie mit 80 mg Propranolol.

Alle Bestimmungen bis auf TBIAb (0 min) erfolgten in jeweils einem Assay. Zu beachten ist die relativ geringe Stimulierung (bis maximal 122%) durch das Serum dieser Patientin im Vergleich zu den Abb. 26 und 27.

Weder TSAb noch TBIAb zeigen in diesem Einzelfall eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf.

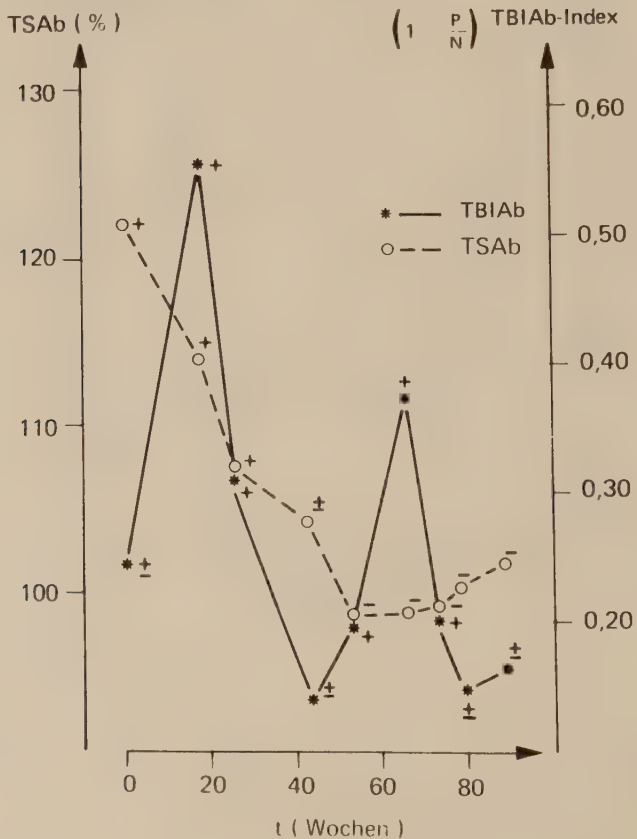


Abb. 28

IV. DISKUSSION

Als Ursache der Hyperthyreose vom Typ Basedow (46) wird heute eine (unkontrollierte) Stimulation der Schilddrüse durch Autoantikörper angesehen (47-49). Eine heute viel diskutierte Vorstellung ist, daß diese Antikörper im Zusammenhang mit einer durch einen T-Suppressorzelldefekt begünstigten Autoimmunthyreoiditis entstehen (50-52) und wie Thyreotropin über den TSH-Rezeptor (53-55) oder benachbarte ähnliche Strukturen (56) Funktionen der Schilddrüsenzelle stimulieren können (57-59).

Zum Nachweis dieser schilddrüsenstimulierenden Antikörper (TSI) bedient man sich ihrer Fähigkeit zur Imitierung thyreotroper Effekte wie TSH-Rezeptorbindung, Aktivierung der Adenylzyklase, Kolloidendozytose, Hormonsekretion, Zellhypertrophie und auch der DNS-Synthese. Alle diese Bestimmungsmethoden nutzen nur partielle Effekte einer thyreotropen Stimulation, es ist also durchaus denkbar, daß bei einem Autoantikörper unterschiedliche Bestimmungsmethoden auch unterschiedliche Ergebnisse bringen können. Dem wird heute Rechnung getragen, indem man nicht mehr von schilddrüsenstimulierenden Immunglobulinen allein, sondern je nach Methode von TSAb, LATS, TBIAb, LATS-Protector, TGI etc. spricht (s. Tab. 3).

Über die Korrelation der Ergebnisse dieser Methoden liegen einige Arbeiten mit widersprüchlichen Ergebnissen vor (s. Tab. 2).

Tabelle 2:

	TBIAb	LATS-P	TSAb
LATS	pos. 63*, 78, 79 neg. 10, 18	pos. 80 neg. /	pos. 9, 81, 7, 5* neg. 82, 74, 5*
TSAb	pos. 83, 11 neg. 84, 9**, 81, 8, 85	pos. / neg. /	
LATS-P	pos. 10 neg. 63		

Positive oder negative Korrelation unter den Meßwerten verschiedener Nachweismethoden für schilddrüsenstimulierende Immunglobuline (Leicht verändert und ergänzt aus (86)).

* Korrelation steigt, wenn nur LATS-positive Serien berücksichtigt werden.

** Arbeit 84 und 9 kommen aus derselben Arbeitsgruppe.

In unserem Laboratorium ist seit 1974 der Radioligandenrezeptorassay für TBIAb etabliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines einfachen Assays für schilddrüsen-adenylzyklasestimulierende Antikörper (TSAb) und der nachfolgende Vergleich der Höhe der TSAb-Aktivität mit der TBIAb-Aktivität im Serum von Patienten mit "toxic diffuse goiter".

A. Entwicklung eines Assays für TSAb

Voraussetzung für unsere Untersuchung ist die Herstellung einer Adenylzyklaseaktivität enthaltenden Membransuspension. Bei der Sichtung der Literatur wurde eine Vielfalt von unterschiedlichen Methoden zur Schilddrüsenhomogenisierung gefunden. Es variierten Sucrosekonzentration, pH der Lösung, Magnesiumgehalt, Albuminzusatz, EDTA- und EGTA-Zusatz sowie die Art und Stärke der Homogenisierung beträchtlich von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe. Wir entschieden uns für die Verwendung einer schnellen, gründlichen und leicht reproduzierbaren

Tabelle 3: Methoden zum Nachweis schilddrüsenstimulierender Immunglobuline (Antikörper, die gegen die Schilddrüsenzellmembran - TSH-Rezeptor und seine Umgebung - gerichtet sind).

A. Bindung an Rezeptoren von humanen Schilddrüsenmembranen

1. Verdrängung von $^{125}\text{Jod-TSH}$, meist b-TSH, von humanen Schilddrüsenmembranen (Radioligandenrezeptor-Assay (3))

TSI	Thyroid Stimulating Immunoglobulins	(18)
TSAb	Thyroid Stimulating Antibodies	(60,61)
TDA	TSH-Displacement Activity	(62)
TDA	TSH-Displacing Activity	(8)
TBII	TSH Binding Inhibitory Immuno- globulins	(10)
TBIA	TSH Binding Inhibitory Activity	(65)
TSH-r-ab	TSH Receptor Antibodies	(64)
TDI	TSH Displacing Immunoglobulins	(65)
HTSI	Human Thyroid Stimulating Ig	(66)
TBA	Thyroid Binding Antibodies	(67)
TBIA/TBIAb	Thyrotropin Binding Inhibiting Antibodies	(68)

2. Blockierung von neutralisierenden Bindungs-
plätzen für LATS an humanen Schilddrüsen-
gewebspräparationen

LATS-P	LATS-Protector	(4)
HTS	Human Thyroid Stimulator	(69)

B. Aktivierung der Adenylatzyklase in humanem Schilddrüsen-
gewebe

HTACS	Human Thyroid Adenylate Cyclase Stimulator	(5,70)
hTSI	Human Thyroid Stimulating Ig	(70)
TSAb	Thyroid Stimulating Antibodies	(71,72)
TSI	Thyroid Stimulating Immunoglobulins	(73)
hTSA	Human Thyroid Stimulating Activity	(8)

C. Aktivierung der Kolloidendozytose in humanen
Thyreozyten

HTS	Human Thyroid Stimulator	(74)
-----	--------------------------	------

D. Cytochemical Bioassay (Labilisierung lysosomaler
Membranen)

TSAb	Thyroid Stimulating Antibodies	(75)
------	--------------------------------	------

E. Stimulierung der Schilddrüsenhormonsekretion

1. Bei Versuchstieren, heterologer Test

LATS	Long Acting Thyroid Stimulator	(76)
MST	Mouse Thyroid Stimulator	(79)

2. In humanen Schilddrüsen-
gewebsschnitten

HTSA	Human Thyroid Stimulating Activity	(6)
------	------------------------------------	-----

F. Stimulation des Schilddrüsenwachstums, heterologes
System

TGI	Thyroid Growth Stimulating Ig	(77)
-----	-------------------------------	------

Homogenisierung von frischem Schilddrüsengewebe in einem Sucrose-Mg-Tris-Puffer und einer fraktionierten Zentrifugation in Tris-Puffer ohne Zusätze.

Beim Inkubationsansatz setzten wir zunächst Theophyllin ein, welches den Abbau des gebildeten cAMP hemmt (88) sowie ein ATP-regenerierendes System (CP,CK), welches nach der Reaktionsgleichung:



eine genügend hohe Konzentration von ATP während der Reaktion aufrechterhalten soll. Das Mg/ATP-Verhältnis wurde wie von Wolff und Jones (14) empfohlen bei 2 gehalten. Auf weitere selten gebrauchte Zusätze, wie EGTA (89), EDTA (90), DMSO (91), NaCl (92) oder KCl (93) wurde verzichtet, um das System möglichst übersichtlich zu gestalten. Fluorid wurde eingesetzt, weil es die Adenylzyklase maximal stimuliert, auf das GTP-Analogon GppNHp wird weiter unten ausführlich eingegangen. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigen alle Fraktionen TSH-, GppNHp- und Fluorid-stimulierbare Adenylzyklaseaktivität. Im 5.000 g Sediment stimulieren 20 mU TSH/ml dreifach, 10^{-4} M GppNHp 20fach und 10^{-2} M Fluorid 50fach.

Wenn man davon ausgeht, daß 100% der Adenylzyklaseaktivität im Homogenat sind, so sedimentiert 10% bei 500 g, 25% bei 5.000 g und 15% bei 25.000 g. Für die weiteren Untersuchungen wurde das 5.000 g Sediment eingesetzt, obwohl auch das 25.000 g Sediment gute Ergebnisse zeigte (Abb. 1).

Mit dem 5.000 g Sediment wurden zunächst eine Reihe von Versuchen zur Optimierung der Inkubationsbedingungen durchgeführt:

1. Die Adenylzyklaseaktivität ist im getesteten Bereich nahezu linear proportional zur Schilddrüsenmembrankonzentration. Dies ist zu erwarten, da anzunehmen ist, daß die Membrankonzentration direkt mit der Enzymkonzentration korreliert. Für spätere Versuche wurden meist 0,075 mg Membranprotein pro Inkubationsansatz (200 µl) eingesetzt, allerdings gaben auch Membranmengen von 0,01 mg gute Resultate.
2. Die cAMP-Produktion ist direkt proportional zur Inkubationszeit. Bis zu einer Zeit von 55 min ist die basal- und TSH-stimulierte cAMP-Produktion in Abhängigkeit von der Zeit linear. Bei noch längeren Inkubationszeiten (2 Stunden) sinkt die spezifische Adenylzyklaseaktivität leicht ab (graphisch nicht dargestellt). Dies kann man auf die beginnende Inaktivierung der Adenylzyklase, z.B. durch lysosomale Enzyme, während der Inkubation zurückführen.
3. Das Temperaturoptimum der Adenylzyklase liegt bei etwa 32 C.
4. Das Optimum der TSH-Stimulation der Adenylzyklase liegt bei einem pH von 7,1, das Optimum der basalen cAMP-Produktion bei etwa 7,4. Walinder et al. (94) finden an humanem Schilddrüsenhomogenat vergleichbare Ergebnisse.

Je nach Membranpräparation liegt die Empfindlichkeit unseres Systems für TSH bei etwa 0,1 bis 1 mU/ml (Abb. 6a, Abb. 9) und damit über dem Spiegel, der bei primären Hypothyreosen auftritt. Die maximale Stimulierung der Adenylzyklase ist bei etwa 1.000 mU/ml zu sehen, sie beträgt je nach Membranpräparation 300% bis 1.000%.

Die TSH-Empfindlichkeit unseres Systems ist mit der anderer Autoren vergleichbar. Kendall-Taylor (7) findet an Schilddrüsenschnitten einen ersten Anstieg der cAMP-Produktion bei 0,3 mU/ml, Onaya et al. (74) bei 0,1 mU/ml, Bech et al. (96) zwischen 0,125 und 1,25 mU/ml. Orgiazzi (5) und Wälinder (94,97) finden eine Stimulierung bereits bei 0.05 mU TSH/ml. Wie die Arbeit von Wolff (14) zeigte, bringt eine weitere Reinigung des Schilddrüsenhomogenates, z.B. durch Dichtegradientenzentrifugation, keine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber TSH. Da weiterhin die maximale Stimulierung durch TSH in unserem Homogenat gut war (meist größer als 600%), verzichteten wir auf eine Weiterreinigung des 5.000 g Sedimentes.

Thyreostimulin^R ist ein ungereinigtes bovines TSH-Präparat, welches sich durch gelchromatographische Auftrennung in einen niedermolekularen und hochmolekularen Teil auftrennen läßt (Abb. 7a). Der Vergleich der hochmolekularen TSH-Fraktion mit einem hochgereinigten TSH und Thyreostimulin^R zeigt keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit (Abb. 7b). Aus der Abbildung geht hervor, daß die niedermolekularen Bestandteile des Thyreostimulins^R in diesen Konzentrationen nicht inhibierend auf die cAMP-Produktion wirken. Der bei 10.000 mU TSH/ml zu beobachtende Abfall der cAMP-Produktion wurde auch von anderen Autoren beobachtet (94,95,96,97), die Verunreinigungen des Thyreostimulins^R scheinen dafür nicht verantwortlich zu sein.

Das ATP-regenerierende System (ARS) wird seit Jahren in den Inkubationsassays eingesetzt. Aufgabe des ARS soll es sein, eine ausreichend hohe Konzentration an ATP während des Versuchs aufrecht zu halten.

Bis zu einer Konzentration von 0,67 mM hat das ARS durchaus

seine Berechtigung (Abb. 8a). Bei höheren ATP-Konzentrationen hat das ARS keinen Einfluß mehr. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ließen wir bei späteren Versuchen das ARS weg.

Theophyllin als Phosphodiesterasehemmer verhindert den Abbau des cAMP durch Phosphodiesterasen. In unseren Versuchen zeigt Theophyllin einen gering hemmenden Einfluß auf die cAMP-Produktion (Abb. 9). Auch wenn man den Einfluß von Theophyllin in dialysiertem Serum testet, findet man einen eher leicht inhibierenden Einfluß (Abb. 21). Dies weist darauf hin, daß auch im dialysierten Serum keine aktiven Phosphodiesterasen mehr vorhanden sind. Zor et al. (88) finden in ihren Untersuchungen eine wesentlich höhere cAMP-Produktion bei Zugabe von Theophyllin. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Zor et al. und unseren Ergebnissen lassen sich mit der unterschiedlichen Membranpräparation erklären. Die Membranpräparation von Zor et al. muß noch aktive Phosphodiesterasen enthalten, so daß der Phosphodiesterasehemmer Theophyllin eine Wirkung zeigen kann.

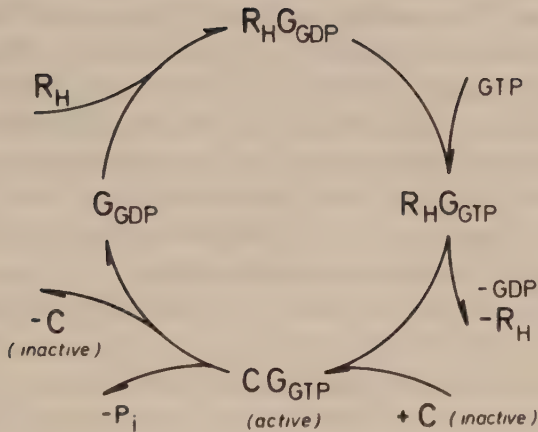
Der Einfluß von Purinnukleotiden auf Schilddrüsenmembranen von Rindern wurde bereits untersucht (98,99,100,101). Wolff (98,101) fand, daß in niedrigen Konzentrationen GTP stärker als ITP wirkt, in höheren Konzentrationen (10^{-5} M) ITP jedoch stärker als GTP stimuliert (ITP = Inosin-5'-triphosphat). Kowalski (100) entdeckte eine gleiche Stimulation von GTP, GDP und GMP in Konzentrationen von 0,1 mM. Burke (99) fand die ITP- und TSH-stimulierte AC-Aktivität doppelt so hoch wie die GTP- und TSH-stimulierende AC-Aktivität, die Stimulation ohne TSH durch GTP und ITP jedoch gleich.

Der Einfluß von GppNHp wurde von Londos et al. (31) untersucht, Desmedt (102) fand an Pferdeschilddrüsen eine addi-

tive Wirkung von maximalen TSH- und GppNHp-Dosen. Plannels und Verrier (103) fanden an Schweineschilddrüsen mit einer durch TSH zwei- bis zweieinhalbfach stimulierbaren AC eine kräftige Stimulierung durch GppNHp bei Vorinkubation mit GppNHp, Präinkubation mit TSH und GppNHp steigerte nochmals um den Faktor 1,5 bis 2. Dieser vollaktivierte Status wurde auch durch Präinkubation mit TSH und Inkubation in Gegenwart von 10 μ M GppNHp erreicht, umgekehrt jedoch hob eine Präinkubation der Membran mit GppNHp den Effekt von TSH auf. Diese Widerstandsfähigkeit gegenüber hormoneller Stimulation konnte nicht durch Abnahme der Affinität des Hormons zum Rezeptor erklärt werden, wie durch TSH-Bindungsstudien gezeigt wurde. Plannels schloß, daß TSH die Anzahl der Enzymmoleküle steigert, die fähig sind, weiter durch GppNHp stimuliert zu werden. Das benutzte AC-System zeigte allerdings keine Stimulierung durch GTP (persönliche Mitteilung).

GTP stimuliert in unseren Versuchen an menschlichen Schilddrüsenmembranen etwa 1,8fach (Abb. 11). Wie schon von Wolff (98,101) an bovinen Schilddrüsen getestet, hat GTP auch an humanen Schilddrüsen einen schwachen, aber signifikanten und reproduzierbaren Einfluß auf die Adenylzyklase. GppNHp, als GTP-ase-resistentes Analogon von GTP, stimuliert die Adenylzyklase bedeutend stärker (Abb. 13), etwa 10- bis 25fach, je nach Membranpräparation. Der Effekt von GppNHp läßt sich mit dem Modell von Pfeuffer (Abb. 29) gut erklären: GppNHp verzögert den Turnover und daraus folgt ein längeres Verweilen der Adenylzyklase in ihrem aktivierten Zustand.

Der Effekt von GppNHp läßt sich durch steigende Dosen GTP vollständig aufheben (Abb. 13,14). Dies belegt die kompetitive Wechselwirkung beider Nukleotide. Das von Pfeuffer (87) vorgeschlagene Modell läßt sich auf die menschliche Schilddrüse gut übertragen.



R_H = HORMONE-RECEPTOR COMPLEX

G = GTP-BINDING PROTEIN

C = CATALYTIC MOIETY

nach Pfeuffer, FEBS 101, Nr. 1, 88, 1979

Abb. 29: Zur Erklärung der Effekte von GTP an Erythrozytenzellmembranen hat Pfeuffer (87) dieses Modell vorgeschlagen: In der Zellmembran befindet sich neben dem Rezeptor und der Adenylzyklase ein sog. G-Protein, welches in der Lage ist, GTP (GDP, GppNHp) zu binden. Das G-Protein, welches GDP angelagert hat, reagiert mit dem Rezeptor-Hormon-Komplex. Nun kann ein Austausch von GDP gegen GTP stattfinden. Erst dadurch wird eine Anlagerung der inaktiven Adenylzyklase und ihre gleichzeitige Aktivierung ermöglicht. Da das G-Protein GTP-ase Aktivität besitzt, wird GTP zu GDP hydrolysiert. Dies bewirkt eine Inaktivierung der Adenylzyklase.

Uns interessiert im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die Frage, ob der "Holocatalytical State" (33) eine Empfindlichkeitssteigerung für TSH bringt. Abb. 16 zeigt, daß die mit GppNHp präinkubierte Membran erst durch hohe TSH-Dosen stimuliert wird. Der Zusatz von 10^{-5} M GTP bei Präinkubation mit 10^{-4} M GppNHp zeigt im Rahmen der Schwankungsbreite des Systems keine Wirkung. Durch höhere Dosen GTP (Abb. 14) kann der durch Präinkubation mit GppNHp aktivierte Zustand der Membran wieder rückgängig gemacht werden.

Präinkubation mit GppNHp führt demnach nicht zur Erhöhung der Sensitivität für TSH.

GTP bewirkt einen verstärkten TSH-Effekt (Abb. 12). Die cAMP-Produktion bei 1.000 mU TSH/ml steigt unter GTP stärker an als der Basalwert bei 0 mU TSH/ml. Es kommt jedoch nicht zu einer Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für TSH (left dose shift), wie Glossmann et al. (44) an Nebennierenrinden fanden.

Die Kombination von GppNHp mit TSH (Abb. 15) ergibt ein ähnliches Bild. Hier steigt der Basalwert jedoch relativ stärker an als der 1.000 mU TSH/ml Wert, so daß ein insgesamt verringerter TSH-Effekt resultiert. Zusatz von GTP verstärkt also den TSH-Effekt, während GppNHp den Effekt verringert.

Eine Zugabe von GTP zu einem Stimulationsassay für schilddrüsenstimulierende Faktoren scheint daher sinnvoll. GTP steigert nicht die Empfindlichkeit für TSH (left dose shift), es führt jedoch zu einem verstärkten TSH-Effekt. Auch unter GTP können wir nicht mehr als bestenfalls 0,1 mU TSH/ml Inkubationsansatz nachweisen, was 0,29 mU TSH/ml Serum entspricht. Die normale TSH-Konzentration im Serum liegt bei weniger als 0,004 mU/ml.

Das dialysierte Serum einer im Radioligandenassay stets hochpositiven Morbus Basedow Patientin stimuliert die Adenyl-

zyklase bei einer Inkubationszeit von 30 min deutlich stärker als das Serum einer Normalperson (Abb. 17). Die Immunglobuline beider Seren zeigen im Vergleich mit den nur dialysierten Seren keine Unterschiede im Zeitverlauf und der Stimulationsrate. Unbehandelte Seren haben einen deutlich geringeren Einfluß auf die Stimulation der Adenylzyklase. Wir führen dies auf die unterschiedlich hohe Konzentration niedermolekularer Bestandteile, z.B. Kalzium und Magnesium, zurück. Beide Ionen haben auch im Radioligandenrezeptorassay einen hemmenden Einfluß auf die Bindung (104). Der durch die TBIAb-positiven Seren verursachte Stimulationseffekt ist bei einer Inkubationszeit von 30 min schon deutlich vorhanden und wird bei 60 und 90 min noch deutlicher (Abb. 18). Das ARS zeigt auf den Verlauf der Kurve keinen Einfluß (Ergebnis graphisch nicht dargestellt, s. Abb. 18). Die Testung von Immunglobulinpräparationen aus Seren im Vergleich zu dialysierten Seren zeigen keinerlei Vorteile der Immunglobulinfraktion (Abb. 19 und 20).

Die Zugabe von GTP/Theophyllin führt zu einer Verschiebung zu insgesamt höherer cAMP-Produktion, besonders sichtbar bei der getesteten Serum-Fraktion. Diese Verschiebung läßt sich nicht auf den Zusatz von Theophyllin zurückführen, da Theophyllin einen eher inhibierenden Einfluß auf die Adenylzyklaseaktivität in dialysiertem Serum hat (Abb. 21). Für diesen Effekt scheint GTP verantwortlich (s. Abb. 12) zu sein.

Der Zusatz von GTP zu einem Stimulationsassay scheint sinnvoll, CP, CK und Theophyllin haben in unserem System keinen optimierenden Einfluß und wurden aus diesem Grund in unserem Assay für schilddrüsenstimulierende Faktoren nicht verwendet. Der Einsatz des ATP-regenerierenden Systems in den in der Literatur beschriebenen Inkubationsansätzen erfolgt wohl mehr aus theoretischen Erwägungen. Es wurde in der Literatur keine

Arbeit gefunden, die sich mit dem Einfluß eines ARS beschäftigt.

Kleinman et al. (105) beschreiben, daß durch eine Präinkubation der Membran mit Serum und GTP die Empfindlichkeit ihres Stimulationsassays deutlich gesteigert werden kann. Einfache Inkubation der Membran mit Immunglobulin führt in ihrem Assay nur zu einem sehr kleinen Anstieg der Adenylzyklaseaktivität gegenüber Werten erhalten durch Normalseren. In unserem System hat die Präinkubation keinen Einfluß auf die Empfindlichkeit (Abb. 22). Es scheint, daß die Präinkubation die Membran lediglich inaktiviert, im TSAb-Assay wurde aus diesem Grunde auf eine Präinkubation verzichtet.

B. Korrelation von TBIAb-und TSAb-Aktivität im Serum

Im ersten Versuch wurden 12 TBIAb-positive und 9 TBIAb-negative Seren von Patienten mit Hyperthyreose und diffus bilateral speichernder Struma (toxic diffuse goiter) getestet (Abb. 23). Die TSAb-Aktivität liegt bei TBIAb-positiven Seren deutlich höher als bei TBIAb-negativen Seren. 8 der 12 TBIAb-positiven Seren sind auch TSAb-positiv, von den restlichen 4 Seren zeigen 2 einen eher blockierenden Einfluß auf die Stimulation der Adenylzyklase. Ähnliche Ergebnisse wurden von Bliddal et al. (11,12) beschrieben. Die Korrelation zwischen TBIAb-Index und TSAb-Stimulation zeigt bei Berücksichtigung der nur TBIAb-positiven Seren einen Korrelationsindex $r = 0,74$. Eine Korrelation ist natürlich nur dann zu erwarten, wenn ein Parameter deutlich nachweisbar ist, bei Nichtnachweisbarkeit wird lediglich die Schwankungsbreite der Ergebnisse (statistischer Fehler) miteinander korreliert. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Orgiazzi et al. (5). Sie fanden eine Verbesserung der Korrelation

zwischen LATS und TSAb bei Berücksichtigung der nur LATS-positiven Seren.

In einem zweiten Versuch wurden 88 Seren, davon 39 TBIAb-positiv und 49 TBIAb-negativ, getestet. Abb. 25 zeigt eine Korrelation von $r = 0,59$ bei Berücksichtigung aller Seren, die Korrelation steigt auf $r = 0,93$, wenn nur 11 Seren von 2 Patienten berücksichtigt werden, die in jeweils einem gemeinsamen Assay bestimmt worden sind. Insgesamt wird TBIAb in 39 von 88 (44%) der Seren gefunden, TSAb in 36 von 88 (41%). Dabei ist zu beachten, daß es sich bei diesen Patienten nicht allein um unbehandelte Hyperthyreose-Patienten handelt, sondern um ein uneinheitlich zusammengesetztes Patientenkollektiv (Seren von Patienten vor/unter/nach thyreostatischer Therapie oder nach Radiojod-Therapie bzw. Operation). Die erzielten Prozentzahlen sind deshalb nicht vergleichbar mit denen an anderen Kollektiven erzielten Zahlen (106).

Vergleicht man TSAb- und TBIAb-Aktivität im Verlauf einer Erkrankung (Abb. 26,27), wenn beide Bestimmungen in jeweils einem Assay durchgeführt worden sind, so ergeben sich im allgemeinen gute bis sehr gute Korrelationen, vor allem, wenn die TSAb- und TBIAb-Aktivitäten deutlich nachweisbar sind.

Wie kommt es zur schlechteren Korrelation zwischen TSAb und TBIAb bei Testung in verschiedenen Assays? Die Verwendung unterschiedlicher Membranen ergibt zwar keine prinzipiell unterschiedlichen Ergebnisse (Abb. 27), es gibt jedoch Membranen mit guter und mäßiger Stimulierbarkeit (von ca. 300 bis 1.000%) und auch ohne TSH-Antwort. Auch sind die Interassayvariabilität des TSAb-Assays (Abb. 27) und des TBIAb-Assays nicht so groß, daß dies als Erklärung ausreichen könnte. Bei der Bewertung der Resultate ist jedoch das größte Problem die Interassay-Vergleichbarkeit von

TBIAb-Indices (und auch der TSAb-Aktivität in Prozent der Stimulation der Normalpersonen).

Der TBIAb-Index wird als Maß für die vorhandene Antikörpermenge eingesetzt. Er berechnet sich folgendermaßen:

$$1 - (\text{Bindung des Patientenserums} : \text{Bindung des Mittelwertes der Normalseren})$$

Bei einer "gut bindenden Membran" mit 17,5% TSH-Bindung bei Normalserum zeigt eine TSH-Bindung von 11% bei einem Patientenserum an, daß es sich um ein TBIAb-positives Serum handelt (TBIAb-Index = 0,37). Bei einer "schlecht bindenden Membran" mit 7,5% TSH-Bindung durch die gleichen Normalseren kann das gleiche Patientenserum die TSH-Bindung vielleicht auf 1,0% reduzieren (TBIAb-Index = 0,87) (Beispiel nach (19)). In diesem Bereich schwanken also TBIAb-Indices für ein Patientenserum, wenn es in verschiedenen Assays an verschiedenen Membranen getestet worden ist. Es ist deshalb nur sehr bedingt möglich, TBIAb-Indices zweier verschiedener Assays zu vergleichen. Dies erklärt sicherlich einen Teil der publizierten negativen Korrelationen zwischen TBIAb-Index und TSAb (8).

Auch wir haben Unterschiede zwischen Thyreotropinbindung-inhibierender Aktivität und Thyreoidea-stimulierender Aktivität beobachtet. 2 Seren aus Abb. 25 sind TSAb-positiv und eindeutig TBIAb-negativ, 9 Seren aus Abb. 25 sind TBIAb-positiv und zeigen keine TSAb-Aktivität. In Abb. 24 zeigen 2 TBIAb-positive Seren einen eher inhibierenden Einfluß auf die Adenylzyklase, ebenso ein TBIAb-negatives Serum. Abb. 28 zeigt unterschiedliche TBIAb- und TSAb-Aktivitäten im Verlauf einer Erkrankung. In Abb. 29 ist jedoch die TSAb-Aktivität relativ schwach ausgeprägt, der Wert für TBIAb (0 min) wurde in einem zweiten Radiorezeptorassay bestimmt und ist deshalb nur bedingt mit den anderen Werten vergleichbar.

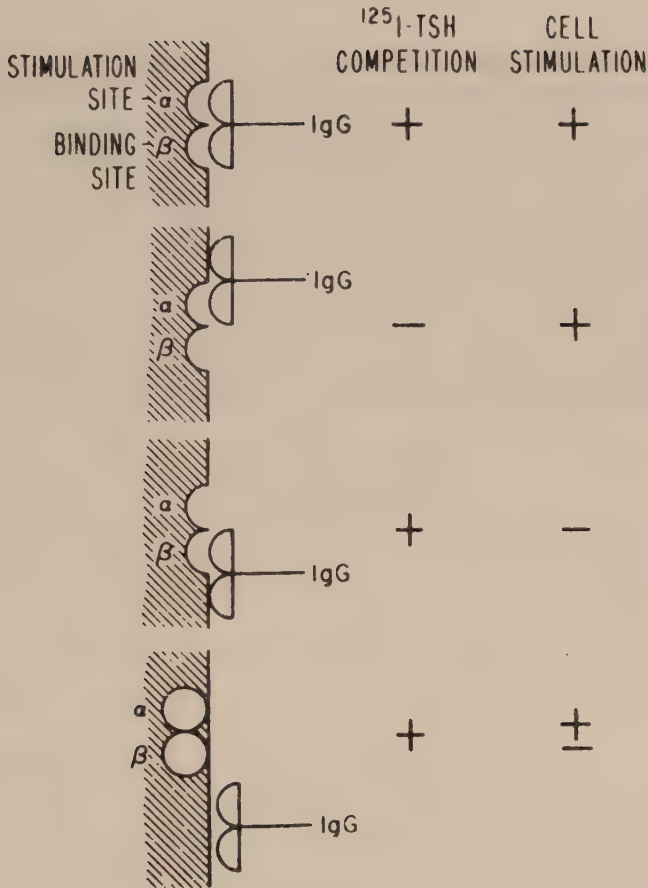


Abb. 30: Hypothetisches Modell zur Wechselwirkung der Immunglobuline mit der Schilddrüsenzellmembran

Dieses Modell setzt voraus, daß TSH mit der α -Untereinheit an die "stimulation site" und mit der β -Untereinheit an die hormonspezifische Stelle bindet (aus Davies (107)).

Diese Ergebnisse gehen konform mit dem Nachweis von sog. blockierenden Antikörpern (10) bei Patienten mit primärer Hypothyreose und wurden auch von anderen Autoren bestätigt. Es ist sicherlich sehr interessant, die Antikörperaktivität (TSAb und TBIAb) bei unbehandelten Patienten im Verlauf ihrer Schilddrüsenüberfunktion zu bestimmen. Die Korrelation der Antikörperaktivitäten mit den peripheren Hormonparametern könnte dem Nachweis dienen, ob das Überwiegen stimulatorischer oder bindungsinhibierender Anteile für den Ausprägungsgrad der Hyperthyreose verantwortlich zu machen ist.

Abb. 29 zeigt einen Antikörperverlauf einer lediglich mit Propranolol behandelten, deutlich hyperthyreoten Patientin. Weder TBIAb- noch TSBa-Aktivität zeigen in diesem Einzelfall eine Korrelation mit den peripheren Hormonparametern. Es sind sicherlich weitere Untersuchungen mit Messung von TBIAb und TSBa in einem Assay an einer Schilddrüsenmembran erforderlich, um dieses Einzelergebnis aus Abb. 28 zu überprüfen.

In Abb. 30 ist ein hypothetisches Modell von Davies (107) zur Erklärung verschiedener Ergebnisse im TBIAb- und TSBa-Assay dargestellt. Berücksichtigt man zusätzlich noch die Zellstimulation über den Phosphatidyl-Inositol-Mechanismus (108), so wird eine positive Korrelation (mit einem Korrelationsfaktor $r \rightarrow 1$) eines Parameters für TSI mit den peripheren Hormonwerten immer unwahrscheinlicher. Erst die Berücksichtigung des gesamten Spektrums schilddrüsenstimulierender oder schilddrüsenblockierender Immunglobuline sowie auch wachstumsstimulierender Immunglobuline, wird eine prognostische Aussage über die periphere Hormonkonzentration oder die Wachstumstendenz der Schilddrüse erwarten lassen.

Es ist wahrscheinlich, daß die Wirkung der Immunglobuline an der Schilddrüse erst durch die Addition der Einzelaktivitäten der schilddrüsenzellmembranaktiven Immunglobuline entsteht. Mit den heutigen Methoden erfassen wir immer nur einen Teil aus der Familie der Stimulatoren und Inhibitoren. Je mehr verschiedene Methoden angewendet werden, desto vollständiger kann das resultierende Bild über die Funktionszustände der Schilddrüse sein. Obwohl bei Einhaltung bestimmter methodischer Vorschriften eine im allgemeinen gute Korrelation zwischen TBIAb und TSAb gesehen wird, kann der TSAb-Wert bei bestimmten klinischen und insbesondere wissenschaftlichen Fragestellungen Zusatzinformationen liefern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoimmunhyperthyreose vom Typ Basedow wird heute als durch schilddrüsenstimulierende Immunglobuline verursacht angesehen.

Neben einem in unserem Labor schon etablierten Radioligandenrezeptorassay für TBIAb (Thyrotropin Binding Inhibiting Antibodies) wurde eine zweite Methode für die Bestimmung von TSAb (Thyroid Stimulating Antibodies) an Schilddrüsenzellmembranpräparationen entwickelt und optimiert.

Besonderer Wert wurde auf die Testung des Einflusses von Guanylnukleotiden gelegt: GTP stimuliert die Schilddrüsenadenylzyklase und verbessert die Stimulierbarkeit der Adenylzyklase durch TSH.

Die Empfindlichkeit des Systems liegt zwischen 0,1 und 1 mU TSH/ml (entsprechend 0,29 mU TSH/ml Serum), mit 1.000 mU TSH/ml läßt sich ein maximaler Anstieg auf 1.000% erreichen.

88 Seren von Patienten mit "toxic diffuse goiter" wurden sowohl auf TBIAb als auch auf TSAb getestet. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation mit einem Korrelationsfaktor $r = 0,59$ bei Berücksichtigung von 77 in verschiedenen Assays bestimmten Seren. Bei Berücksichtigung von 11 Seren, die in jeweils einem Assay bestimmt wurden, erhöhte sich die Korrelation auf $r = 0,93$.

Die Korrelation von TBIAb und TSAb ergibt im Verlauf der Erkrankung bei Einhaltung bestimmter methodischer Vorschriften im allgemeinen eine gute Korrelation; es wird aber auch ein Fall geschildert, in dem TBIAb- und TSAb-Aktivität dissoziieren.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. D.D. Adams and H.D. Purves
Abnormal responses in the assay of thyrotropin.
Proc. Univ. Otago Med. School 34: 11, 1956
2. J.M. McKenzie
The bioassay of thyrotropin in serum.
Endocrinology 63: 372, 1958
3. H. Schleusener, P. Kotulla, R. Finke, H. Sörje,
H. Meinhold, F. Adlkofer, K.W. Wenzel
Relationship between thyroid status and Graves'
disease-specific immunoglobulins.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 379, 1978
4. D.D. Adams, T.H. Kennedy
Occurrence in thyrotoxicosis of a gamma globulin
which protects LATS from neutralization by an
extract of thyroid gland.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 27: 173, 1967
5. J. Orgiazzi, D.E. Williams, I.J. Chopra, D.H. Solomon
Human thyroid adenylate cyclase-stimulating
activity in immunoglobulin G of patients with
Graves' disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42: 341, 1976
6. I. Takata, Y. Suzuki, K. Saida, T. Sato
Human thyroid stimulating activity and clinical
state in antithyroid treatment of juvenile
Graves' disease.
Acta endocrinol. 94: 46, 1980

7. P. Kendall-Taylor
Effects of LATS and LATS-protector on human
thyroid adenylate cyclase activity.
British Med. J. 3: 72, 1973
8. A. Sugenoja, A. Kidd, V.V. Row and R. Volpé
Correlation between thyrotropin-displacing
activity and human thyroid-stimulating activity
by immunoglobulins from patients with Graves'
disease and other thyroid disorders.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 398, 1979
9. E. Macchia, G.F. Fenzi, F. Monzani, F. Lippi, P. Vitti,
L. Grasso, L. Baschieri and A. Pinchera
Comparison between thyroid stimulating and TSH-
binding inhibiting immunoglobulins of Graves'
disease.
Clin. Endocrinol. (Oxf.) 15: 175, 1981
10. K. Endo, K. Kasagi, J. Konishi, K. Ikekubo, T. Okuno,
Y. Takeda, T. Mori and K. Torizuka
Detection and properties of TSH-binding inhi-
bitor immunoglobulins in patients with Graves'
disease and Hashimoto's thyroiditis.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46: 734, 1978
11. H. Bliddal, K. Bech, P.H. Petersen, K. Siersbaek-Nielsen
and T. Friis
Evidence of a correlation between thyrotropin
receptor binding inhibition and thyroid
adenylate cyclase activation by immunoglobulins
in Graves' disease before and during longterm
treatment.
Acta Endocrinol., 1982, in press

12. H. Bliddal, K. Bech, T. Friis

Correlation between thyrotropin binding and adenylate stimulating immunoglobulins in Graves' disease (GD) before and during medical treatment. 11th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Pisa, Annales d'Endocrinologie t. 42, 1981 (abstr. 50)

13. E. Yavin, W.A. Valente, M.D. Schneider and L.D. Kohn

Monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor. 11th Meeting of the European Thyroid Association, Pisa, Annales d'Endocrinologie, 1981 (abstr. 82)

14. J. Wolff and A.B. Jones

The purification of bovine thyroid plasma membranes and the properties of membrane bound adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. 246: 3939, 1971

15. P. Glynn, D.M.F. Cooper and D. Schulster

The regulation of adenylate cyclase of the adrenal cortex. Molecular and Cellular Endocrinology 13: 99, 1979

16. M. Rodbell

The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284: 17, 1980

17. S.Q. Mehdi, S.S. Nussey

A radio-ligand receptor assay for LATS - inhibition by the long-acting thyroid stimulator of the binding of radiiodinated thyroid-stimulating hormone to human thyroid membranes. Biochem. J. 145: 105, 1975

18. B.R. Smith, R. Hall
Thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease.
Lancet II: 427, 1974
19. R. Finke
Schilddrüsenstimulierende Immunglobuline im Verlauf des Morbus Basedow.
Inaugural-Dissertation, Medizinische Fachbereiche, Freie Universität Berlin, 1980
20. A.L. Steiner, D.M. Kipnis, R. Utiger, C. Parker
Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'cyclic phosphate.
Proc. Natl. Acad. Sci. 64: 367, 1969
21. Y. Salomon, C. Londos, M. Rodbell
A highly sensitive adenylate cyclase assay.
Anal. Biochem. 58: 541, 1974
22. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
Proteinmeasurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265, 1951
23. D.M. Weir
Salt fractionation of immunoglobulins.
In: Handbook of Experimental Immunology.
Blackwell Scientific Publications 1: p. 6.2., 18.8., 1973
24. M. Rodbell, P.M. Lad, T.B. Nielsen, D.M.F. Cooper, W. Schlegel, M.S. Preston, C. Londos and E.S. Kempner
The structure of adenylate cyclase systems.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 3, 1981

25. P. Cuatrecasas and V. Bennet
Hormone receptors and their function in cell membranes.
In: Perspectives in Membrane Biology.
S. Estrada-O., C. Gitler (eds.), Academic Press, New York, p. 439, 1977
26. C. De Haën
The non-stoichiometric floating receptor model for hormone sensitive adenylyl cyclase.
J. theor. Biol. 58: 383, 1976
27. M. Rodbell, L. Birnbauer, S.L. Pohl, M.J. Krans
The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action.
J. Biol. Chem. 246: 1877, 1971a
28. M. Rodbell, H.M.J. Kraus, S.L. Pohl, L. Birnbaumer
The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of ^{125}I -glucagon.
J. Biol. Chem. 246: 1872, 1971b
29. M. Rodbell, M.C. Lin, Y. Salomon, C. Londos, J.P. Harwood, B.R. Martin, M. Rendell and M. Berman
Role of adenine and guanine nucleotides in the activity and response to adenylate cyclase systems to hormones: Evidence for multisite transition states.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 3, 1975

30. P. Cuatrecasas, V. Bennett and S. Jacobs
Irreversible stimulation of adenylate cyclase activity of fat cell membranes by phosphoramidate and phosphonate analogues of GTP.
J. Memb. Biol. 23: 249, 1975
31. C. Londos, Y. Salomon, M.C. Lin, J.P. Harwood, M. Schramm, J. Wolff and M. Rodbell
5'guanylylimidodiphosphate, a potent activator of adenylcyclase systems in eukaryotic cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 3087, 1974
32. L. Birnbaumer and P.-C. Yang
Studies on receptor-mediated activation of adenylate cyclases. III. Regulation by purine nucleotides of the activation of adenylate cyclases from target organs for prostaglandins, luteinizing hormones, neurohypophyseal hormones and catecholamines. Tissue and hormone-dependent variations.
J. Biol. Chem. 249: 7867, 1974
33. A.M. Spiegel, E.M. Brown, S.A. Fedak, C.J. Woodart and G.D. Aurbach
Holocatalytical state of adenylate cyclase in turkey erythrocyte membranes: Formation with Gpp(NH)p plus isoproterenol without effect on affinity of β -receptor.
J. Cyclic. Nucleotide Res. 2: 47, 1976
34. M. Schramm and M. Rodbell
A persistent active state of the adenylyl cyclase system produced by the combined actions of isoproterenol and guanylyl imidodiphosphate in frog erythrocyte membranes.
J. Biol. Chem. 250: 2232, 1975

35. D. Cassel and Z. Selinger
Catecholamine-stimulated GTP-ase activity in
turkey erythrocyte membranes.
Biochem. Biophys. Acta 452: 538, 1976
36. L.T. Williams and R.J. Lefkowitz
Slowly reversible binding of catecholamine to
a nucleotide-sensitive state of the β -adrenergic
receptor.
J. Biol. Chem. 252: 7207, 1977
37. M.E. Maguire, E.M. Ross and A.G. Gilman
 β -adrenergic receptor: Ligand binding properties
and the interaction with adenylyl cyclase.
Adv. Cyclic. Nucl. Res. 8: 1, 1977
38. P.M. Lad, A.F. Welton and M. Rodbell
Evidence for distinct guanine nucleotide sites
in the regulation of the glucagon receptor and
of adenylyl cyclase activity.
J. Biol. Chem. 252: 5942, 1977
39. R.J. Lefkowitz, D. Mulliken and M.G. Caron
Regulation of β -adrenergic receptors by
Gpp(NH)p and other purine nucleotides.
J. Biol. Chem. 251: 4686, 1976
40. M.C. Lin, A.F. Welton and M.F. Berman
Essential role of GTP in the expression of
adenylyl cyclase activity after cholera
toxin treatment.
J. Biol. Chem. 252: 2790, 1977

41. Y. Salomon and M. Rodbell

Evidence for specific binding sites for guanine nucleotides in adipocyte and hepatocyte plasma membranes. A. Difference in fate of GTP and Gpp(NH)p.

J. Biol. Chem. 250: 7245, 1975

42. A. Levitzki

The role of GTP in the activation of adenylate cyclase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 74: 1154, 1977

43. C. Londos and M. Rodbell

Multiple inhibitory and activating effects of nucleotides and magnesium on adrenal adenylate cyclase.

J. Biol. Chem. 250: 3459, 1975

44. H. Glossmann and H. Gips

Bovine adrenal cortex adenylate cyclase: Properties of the particulate enzyme and effects of guanyl nucleotides.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 289: 77, 1975

45. A.M. Spiegel and G.D. Aurbach

Binding of 5'-guanylyl-imidodiphosphat to turkey erythrocyte membranes and effects on β -adrenergic-activated adenylate cyclase.

J. Biol. Chem. 249: 7630, 1974

46. C.A. von Basedow

Exophthalmus durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle.

Wochenschrift für die gesamte Heilkunde 6: 197f und 220f, 1840

47. J. Brown, K.J. Dorrington, J. Ensor, B.R. Smith and D.S. Munro
Observations on the nature and significance of the long-acting thyroid stimulator.
Proc. roy. Soc. Med. (London) 61: 1301, 1968
48. S.M. Dirmikis, S.K. Justice and D.S. Munro
Association of the long-acting thyroid stimulator protector with the immunoglobulin G fraction of serum from patients with thyrotoxicosis.
Biochem. Biophys. Acta 379: 239, 1974
49. P. Kriss, V. Pleshakov and J.R. Chien
Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24: 1005, 1964
50. J.M. McKenzie in discussion of:
J.M. McKenzie
The long-acting thyroid stimulator: IA's role in Graves' disease.
Rec. Progr. Horm. Res. 23: 1, 1967
51. F.J. Seif und F. Heni
Zur Pathogenese des Morbus Basedow - Versuch einer immunologischen Interpretation.
Med. Welt 28: 509, 1977
52. R. Volpé
The role of autoimmunity in hypoendocrine and hyperendocrine function (Review).
Ann. Int. Med. 87: 86, 1977

53. F. Adlkofer, P. Kotulla and H. Schleusener
Binding of thyrotropin to low molecular weight
fragments of human thyroid membranes.
Acta Endocrinol. 94: 58, 1980
54. G. Fenzi, E. Macchia, L. Bartalena, F. Mazzanti,
L. Baschieri and L.J. De Groot
Radio-receptor assay of TSH: its use to detect
thyroid-stimulating immunoglobulins.
J. Endocr. Invest. 1: 17, 1978
55. S.Q. Mehdi
Evidence that human thyroid stimulating immuno-
globulins of Graves' disease are antibodies to
human thyroid cell-surface antigens.
Biochemical Basis of Thyroid Stimulation and
Thyroid Hormon Action. A. von zur Mühlen and
H. Schleusener, eds. Thieme Publ., Stuttgart,
New York, S. 48, 1976
56. T. Mäkinen, G. Wägar, L. Apter, E. von Willebrand and
F. Pekonen
Evidence that the TSH-receptor acts as a mito-
genic antigen in Graves' disease.
Nature 275: 314, 1978
57. J.B. Field, A. Remer, G. Bloom and J.P. Kriss
In vitro stimulation by long-acting thyroid
stimulator of thyroid glucose oxidation and
³²P incorporation into phospholipids.
J. Clin. Investigation 47: 1552, 1968

58. T.W. Scott, B.F. Good and K.A. Ferguson
Comparative effects of long-acting thyroid stimulator and pituitary thyrotropin on the intermediate metabolism of thyroid tissue in vitro.
Endocrinology 79: 949, 1966
59. Y. Shishiba, D.H. Solomon and W.D. Davidson
Comparison of the effect of thyrotropin and long-acting thyroid stimulator on glucose oxidation and endocytosis in canine thyroid slices.
Endocrinology 86: 183, 1970
60. C.R. Strakosch, D. Joyner, J.R. Wall
Thyroid-stimulating antibodies in patients with autoimmune disorders.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 361, 1978
61. T.F. Davies, P.P.B. Yeo, D.C. Evered, F. Clark, B.R. Smith, R. Hall
Value of thyroid stimulating antibody determination in predicting short-term thyrotoxic relapse in Graves' disease.
Lancet I, 1181, 1977
62. J. O'Donnell, K. Trokoudes, J. Silverberg, V.V. Row, R. Volpé
Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46: 770, 1978

63. Y. Ozawa, R.M.B. Maciel, I.J. Chopra, D.H. Solomon and G.N. Beall
Relationship among immunoglobulin workers in Graves' disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 381, 1979
64. G. Schernthaner, H. Ludwig, H. Schleusener, R. Finke, P. Kotulla, W.R. Mayr
TSH-receptor antibodies, HLA B8 and thyroid autoantibodies in patients with Graves' disease in therapeutically induced euthyroidism.
Experientia 35: 1408, 1979
65. H. Schleusener, K. Joseph, J. Mahlstedt, P. Kotulla, U. Bogner, B. Wenzel, H. Meinhold
Differences between immunogenic toxic diffuse goiter (Graves' disease) and goiter with disseminated autonomy - preliminary results.
J. Molecul. Med. 4: 129, 1980
66. H. Schleusener
Thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease.
In: Regulation of Thyroid Function. E. Klein, D. Reinwein (eds.), F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, p. 159, 1976
67. J.R. Wall, C.R. Strakosch, A. Trewin, D.M. Joyner
In vitro production of thyroid-binding antibodies by peripheral blood lymphocytes from patients with Graves' disease: Nonspecific responses associated with culture supernatant proteins.
J. Endocrinol. Invest. 2: 261, 1979

68. J. Hensen, P. Kotulla, H. Schleusener
Comparison of TSH binding inhibition and thyroid
adenylate cyclase stimulation in sera of
hyperthyroid patients.
Acta endocrinologica, Suppl. 246: 73, 1982
(abstr.)
69. D.D. Adams, S. Dirmikis, D. Doniach, D.J. El Kabir,
R. Hall, H.K. Ibbertson, W.J. Irvine, P. Kendall-
Taylor, S.W. Manley, S.Q. Mehdi, D.S. Munro,
H.D. Purves, B.R. Smith, R.D.H. Stewart
Nomenclature of thyroid-stimulating antibodies.
Lancet I: 1201, 1975
70. A.J.S. Know, C. v. Westarp, V.V. Row, R. Volpé
Thyroid antigen stimulates lymphocytes from
patients with Graves' disease to produce
thyroid-stimulating immunoglobulins (TSI).
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 330, 1976
71. J.M. McKenzie, M. Zakarija
Factors and concepts in autoimmune stimulation
of the thyroid.
In: Autoimmunity in Thyroid Diseases. E. Klein,
F.A. Horster, eds. Schattauer Publ. Stuttgart -
New York, S. 107, 1979
72. J.M. McKenzie, M. Zakarija
LATS in Graves' disease.
Rec. Progr. Horm. Res. 33: 29, 1977
73. K. Bech, S. Nistrup Madsen, L. Korsgaard Christensen
Thyroid adenylate cyclase stimulating immuno-
globulins in thyroid disorders.
Ann. d'Endocrinologie 39: 23A, 1978 (Abstr.)

74. T. Onaya, M. Kotani, T. Yamada, Y. Ochi
New in vitro tests to detect the thyroid
stimulator in sera from hyperthyroid patients
by measuring colloid droplet formation and
cAMP in human thyroid slices.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 859, 1973
75. N. Loveridge, M. Zakarija, L. Bitensky, J.M. McKenzie
The cytochemical bioassay for thyroid-stimulat-
ing antibody of Graves' disease: Further ex-
perience.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49: 610, 1979
76. D.D. Adams
Bioassay of long-acting thyroid stimulator
(L.A.T.S.), the dose-response relationship.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 21: 799, 1961
77. H.A. Drexhage, G.F. Botazzo, D. Doniach, L. Bitensky,
J. Chayen
Evidence for thyroid-growth-stimulating immuno-
globulins in some goitrous thyroid diseases.
Lancet II: 287, 1980
78. R. Docter, G. Bos, T.J. Visser and G. Hennemann
Thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins
in Graves' disease before, during and after
antithyroid therapy, and its relation to LATS.
Clinical Endocrinology 12: 143, 1980

79. H. Schleusener, P. Kotulla, G. Kruck, D. Geissler
and F. Adlkofer
Comparison and evaluation of the radio-ligand
receptor assay and the mouse bioassay for the
detection of human thyroid stimulating immuno-
globulins.
In: J. Robbins and L.E. Braverman (eds.)
Thyroid Research VII, *Experta Medica*, Amsterdam,
p. 414, 1976
80. S.M. Dirmikis and D.S. Munro
Placental transmission of thyroid-stimulating
immunoglobulins.
Brit. Med. J. II: 665, 1975
81. J.M. McKenzie, M. Zakarija and A. Sato
Humoral immunity in Graves' disease.
Clinics in Endocrinology and Metabolism 7: 31,
1978
82. J.M. McKenzie and M. Zakarija
A reconsideration of a thyroid-stimulating
immunoglobulin as the cause of hyperthyroidism
in Graves' disease.
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 41: 778, 1976
83. E.D. Mukhtar, B.R. Smith, P. Vice, R. Hall and G.A. Pyle
Reaction of thyroid-stimulating immunoglobulins
to thyroid function and effects of surgery,
radioiodine and antithyroid drugs.
Lancet, i: 713, 1975

84. A. Pinchera, G.F. Fenzi, P. Vitti, R. Toccafondi and L. Baschieri
Relationship between TSH receptor and thyroid plasma membrane antigens for Graves' disease immunoglobulins.
Proceedings of the Sixth International Congress of Endocrinology, February 10-16, p. 134, 1980
85. N. Kuzuya, S.C. Chiu, H. Ikeda, H. Uchimura, K. Ito, S. Nagataki
Correlation between thyroid stimulators and 3,5,3'-triiodothyronine suppressibility in patients during treatment for hyperthyroidism with thionamide drugs: Comparison of assays by thyroid-stimulating and TSH-displacing activities.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48: 706, 1979
86. F.J. Seif
Schilddrüsenstimulierende Immunglobuline oder Antikörper-Vergleich mehrerer Bestimmungsmethoden.
Programm und Diskussionsunterlagen zur Jahrestagung der Sektion Schilddrüse der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Berlin, 5. und 6.12.1980, S. 156
87. T. Pfeuffer
Guanine nucleotide-controlled interactions between components of adenylate cyclase.
FEBS Letters 101: 85, 1979
88. U. Zor, T. Kaneko, I.P. Lowe, G. Bloom, J.B. Field
Effect of TSH and prostaglandins on thyroid adenylate cyclase activation and cAMP.
J. Biol. Chem. 244: 5189, 1969

89. W.V. Moore and J. Wolff

Binding of prostaglandin E_1 to beef thyroid membranes.

J. Biol. Chem. 248: 5705, 1973

90. S.N. Madsen and K. Bech

TSH and TSAb activate thyroid adenylate cyclase through different pathways.

Acta Med. Scand. 624: 35, 1979

91. R. Marcus and G.D. Aurbach

Bioassay of parathyroid hormone in vitro with a stable preparation of adenyl cyclase from a rat kidney.

Endocrinology 85: 801, 1969

92. J.D.M. Albano, D.V. Maudsley, B.L. Brown

A simplified procedure for the determination of adenylate cyclase activity.

Biochem. Soc. Trans. 1: 477, 1973

93. V. Macchia and M.F. Meldolesi

Cell membrane of thyroid and its altered responsiveness to the hormon TSH.

Advances in Cytopharmacology 2: 33, 1974

94. O. Wälinder, F.A. Karlsson, P.A. Dahlberg

Adenylate cyclase activity in human thyroid plasma membranes from normal human thyroid tissue and thyroid adenomas.

Acta Endocrin. 92: 95, 1979

95. G. Stöckle, R. Wahl, F.J. Seif

Micromethod of human thyrocyte cultures for detection of thyroid-stimulating antibodies and thyrotropin.

Acta Endocrinologica 97: 369, 1981

96. K. Bech and S.N. Madsen
Human thyroid adenylate cyclase in non-toxic
goitre: sensitivity to TSH, fluoride and TSI.
Clinical Endocrinology 8: 457, 1978
97. F.A. Karlsson, P.A. Dahlberg and O. Wålinder
Activation of membrane-bound adenylcyclase
by thyroid stimulating antibodies.
Acta Endocrinologica 97: 60, 1981
98. J. Wolff and G. Hope Cook
Activation of thyroid membrane adenylate
cyclase by purine nucleotides.
J. Biol. Chem. 248: 350, 1973
99. G. Burke
Comparative effects of purine nucleotides on
thyrotropin - and prostaglandin E_1 - responsive
adenylate cyclase in thyroid plasma membrane.
Prostaglandins 3: 537, 1973
100. K. Kowalski, S. Sato, G. Burke
TSH- and prostaglandin E_2 -responsive adenylate
cyclase in thyroid plasma membranes.
Prostaglandins 2: 441, 1972
101. J. Wolff and G. Hope Cook
Charge effects in the activation of adenylate
cyclase.
J. Biol. Chem. 250: 6897, 1975
102. D.H. Desmedt
Regulation of thyroid adenyl cyclase activity
by calcium and guanyl nucleotides.
Arch. Int. Phys. Biochim. 37: 403, 1977

103. R. Planells, B. Verrier

Adenylate cyclase of porcine thyroid plasma membranes: Effect of Gpp(NH)p.

10th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Newcastle upon Tyne, Annales d'Endocrinologie 31A, 1979 (abstr.)

104. P. Kotulla and H. Schleusener

Solubilized TSH-receptor: its usefulness for the radioligand receptor assay for TSH and TSH-displacing antibodies.

J. Endocrinol. Invest. 4: 155, 1981

105. R.E. Kleinman, L.E. Braverman, A.G. Vagenakis,

R.W. Butcher, R.B. Clark

A new method for measurement of human thyroid-stimulating immunoglobulins.

J. Lab. Clin. Med. 95: 581, 1980

106. H. Schleusener, R. Finke, P. Kotulla, K.W. Wenzel,

H. Meinhold, H.D. Roedler

Determination of the thyroid stimulating immunoglobulins (TSI) during the course of Graves' disease. A reliable indicator for remission and persistence of this disease?

J. Endocrinol. Invest. 2: 155, 1978

107. T.F. Davies

The propensity of the human TSH-receptor to interact with serum immunoglobulins.

Thyroid Research VIII, Proceedings of the 8th International Thyroid Congress, Sydney, p. 711, 1980

108. J.E. Dumont, A. Takeuchi, F. Lamy, C. Gervy-Decoster,
P. Cochaux, P. Roger, J. Van Sande, R. Lecocq,
J. Mockel

Thyroid Control: An example of a complex cell
regulation network.

Adv. Cycl. Nucl. Res. 14: 479, 1981

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken

bei Herrn Prof. Dr. med. Horst Schleusener

für die Überlassung des Themas
und die stete Bereitschaft zur Diskussion

bei Herrn Dr. Ing. Peter Kotulla

der mich in die Methodik einführte
und mich bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit
jederzeit beraten hat

bei allen Mitarbeitern der Schilddrüsenarbeitsgruppe

insbesondere bei Frau Jutta Kölm für die exakte
Durchführung einiger Stimulationsassays



Lebenslauf

Am 16. April 1953 wurde ich, Johannes Hensen, als drittes Kind des Justizbeamten Johannes Hensen und seiner Ehefrau Gesine, geb. Brakhuis, in Papenburg/Ems geboren.

Nach der Grundschule (Mühlenschule Papenburg) besuchte ich das Gymnasium Papenburg bis zum Abitur im Jahre 1973. Die Wehrpflicht erfüllte ich als Sanitätssoldat vornehmlich in Oldenburg bis zum Herbst 1974.

Zum Wintersemester 1974/75 immatrikulierte ich mich an der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster/Westfalen für das Studium der Chemie. Nach Ablegung der Zwischenprüfung begann ich zum Wintersemester 1976/77 das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.

Im Sommer 1978 trat ich als Doktorand in die Schilddrüsenforschungsgruppe des Klinikum Steglitz der Freien Universität (Prof. Schleusener) ein, wo ich auch von Juni 1979 bis April 1982 als studentische Hilfskraft arbeitete.

Meine Famulatur leistete ich u.a. beim "Flying Doctor Service" in Port Augusta/Australien, im Royal Adelaide Hospital/Australien sowie in einem Flüchtlingslager an der Grenze Kambodscha/Thailand ab.

Im Januar 1981 bestand ich das von den U.S.A. durchgeführte medizinische Examen "ECFMG". Es folgte bis zum März 1982 das "Praktische Jahr" in den Fächern Innere Medizin, Gynäkologie und Chirurgie im Klinikum Steglitz.

Am 26. April 1982 erhielt ich meine Approbation als Arzt und arbeite seit dem 1. Mai 1982 als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Schilddrüsenforschungsgruppe des Klinikum Steglitz.

Ich bin seit Oktober 1981 mit der Medizinstudentin Jutta Vogt aus Berlin verheiratet. Im Juli 1982 wurde unsere Tochter Henni geboren.

